

Rolle der Syntrophine alpha und beta2 in der nicht-alkoholischen Steatohepatitis



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von

Lisa Rein-Fischböck, geborene Voggenreiter

aus Passau

im Jahr

2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

22.09.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Christa Büchler

Unterschrift:

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis:

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 10 |
| 1.1 | Funktionen und Aufbau der Leber..... | 11 |
| 1.2 | Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) | 12 |
| 1.2.1 | Spektrum der NAFLD | 12 |
| 1.2.2 | Prävalenz der NAFLD..... | 13 |
| 1.2.3 | Pathogenese der NAFLD – eine multifaktorielle Erkrankung..... | 14 |
| 1.2.3.1 | Insulinresistenz..... | 14 |
| 1.2.3.2 | Dysfunktion des Fettgewebes..... | 16 |
| 1.2.3.3 | Darmmikrobiom | 16 |
| 1.2.3.4 | Genetische Faktoren | 17 |
| 1.2.4 | Diagnose der NAFLD..... | 19 |
| 1.2.5 | Behandlung der NAFLD..... | 19 |
| 1.3 | Syntrophine | 20 |
| 1.3.1 | Aufbau und Struktur der Syntrophine..... | 21 |
| 1.3.2 | Funktionen der Syntrophine..... | 21 |
| 1.3.3 | Interaktionspartner der Syntrophine..... | 21 |
| 1.3.3.1 | Interaktion mit dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex | 21 |
| 1.3.3.2 | Interaktion mit Kanalproteinen | 22 |
| 1.3.3.3 | Interaktion mit Rezeptoren..... | 22 |
| 1.3.3.4 | Interaktion mit weiteren Proteinen..... | 23 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit..... | 25 |
| 2 | Material und Methoden | 27 |
| 2.1 | Materialliste | 28 |
| 2.1.1 | Geräte | 28 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterialien..... | 30 |
| 2.1.3 | Chemikalien..... | 31 |
| 2.1.4 | Lösungen und Puffer | 34 |
| 2.1.4.1 | Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit Nukleinsäuren | 34 |
| 2.1.4.2 | Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit Proteinen..... | 34 |
| 2.1.4.2.1 | Lösungen und Puffer für die Extraktion von Proteinen | 34 |
| 2.1.4.2.2 | Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE | 35 |
| 2.1.4.2.3 | Lösungen und Puffer für das Western Blotting..... | 36 |
| 2.1.4.2.4 | Lösungen und Puffer für die Antikörperfärbung spezifischer Proteine..... | 36 |
| 2.1.4.2.5 | Lösungen für die Färbung aller Proteine..... | 36 |
| 2.1.4.2.6 | Lösungen und Puffer für den ELISA | 37 |
| 2.1.4.3 | Lösungen und Puffer für die Sirius-Red-Färbung..... | 37 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.1.4.4 | Lösungen und Puffer für die immunhistochemische Färbung..... | 37 |
| 2.1.4.5 | Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung | 38 |
| 2.1.5 | Medien für die Kultivierung von Prokaryoten und Eukaryoten | 38 |
| 2.1.5.1 | Medien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen | 38 |
| 2.1.5.2 | Lösungen und Medien für die Kultivierung und Selektion von prokaryotischen Zellen (<i>E. coli</i>)..... | 39 |
| 2.1.6 | Enzyme | 39 |
| 2.1.7 | Antikörper | 39 |
| 2.1.7.1 | Primäre Antikörper..... | 39 |
| 2.1.7.2 | Sekundäre Antikörper | 41 |
| 2.1.8 | Oligonukleotide (Primer) | 41 |
| 2.1.8.1 | Primer für die semiquantitative Real-Time PCR Analysen muriner Gene.... | 41 |
| 2.1.8.2 | Primer für die semiquantitative Real-Time PCR Analysen humaner Gene.. | 43 |
| 2.1.8.3 | Klonierung von murinen Genen in pHTN HaloTag® CMV-neo..... | 43 |
| 2.1.8.3.1 | Primer für die PCR..... | 43 |
| 2.1.8.3.2 | Primer für die Sequenzierung | 44 |
| 2.1.8.4 | siRNAs | 44 |
| 2.1.9 | Kitsysteme..... | 44 |
| 2.1.10 | Organismen..... | 45 |
| 2.1.10.1 | Eukaryoten | 45 |
| 2.1.10.2 | Prokaryoten | 46 |
| 2.2 | Methoden | 46 |
| 2.2.1 | Arbeiten mit humanen Proben | 46 |
| 2.2.1.1 | Patienten mit nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD) | 46 |
| 2.2.1.2 | Patienten mit hepatozellulärem Karzinom | 47 |
| 2.2.2 | Arbeiten mit Versuchstieren..... | 48 |
| 2.2.2.1 | Tierhaltung | 48 |
| 2.2.2.2 | Syntrophin-Knockout-Mäuse..... | 49 |
| 2.2.2.3 | Diät-induzierte Fettlebererkrankung im Tiermodell..... | 49 |
| 2.2.2.3.1 | Methionin- und Cholin-defiziente Diät | 49 |
| 2.2.2.3.2 | Atherogene Paigendiät | 50 |
| 2.2.2.3.3 | Hochfettdiät und intraperitoneale Insulin-Injektion..... | 50 |
| 2.2.2.4 | Präparation..... | 51 |
| 2.2.3 | Arbeiten mit Zellen..... | 51 |
| 2.2.3.1 | Arbeiten mit eukaryotischen Zellen | 51 |
| 2.2.3.1.1 | Isolation von primären Hepatozyten und primären Sternzellen | 51 |
| 2.2.3.1.2 | Kultivierung von hepatischen Zelllinien | 52 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 2.2.3.1.3 | Aussäen von Zellen für Transfektionsversuche..... | 52 |
| 2.2.3.1.4 | RNA-Interferenz..... | 53 |
| 2.2.3.1.5 | Transiente Überexpression von Proteinen | 54 |
| 2.2.3.1.6 | Bestimmung der Zytotoxizität..... | 55 |
| 2.2.3.2 | Arbeiten mit prokaryotischen Zellen..... | 55 |
| 2.2.3.2.1 | Kultivierung von <i>E. coli</i> | 55 |
| 2.2.3.2.2 | Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 55 |
| 2.2.3.2.3 | Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> | 56 |
| 2.2.4 | Arbeiten mit Nukleinsäuren..... | 56 |
| 2.2.4.1 | Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren | 56 |
| 2.2.4.2 | Arbeiten mit DNA..... | 57 |
| 2.2.4.2.1 | Polymerasekettenreaktion | 57 |
| 2.2.4.2.2 | Agarosegelelektrophorese | 58 |
| 2.2.4.2.3 | Gelextraktion von DNA-Fragmenten | 58 |
| 2.2.4.2.4 | Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen | 59 |
| 2.2.4.2.5 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau..... | 59 |
| 2.2.4.2.6 | Ligation von DNA-Fragmenten | 60 |
| 2.2.4.2.7 | Sequenzierung bei GeneArt..... | 60 |
| 2.2.4.3 | Arbeiten mit RNA..... | 61 |
| 2.2.4.3.1 | Isolation von RNA mit TRIzol® | 61 |
| 2.2.4.3.1.1 | Isolation von RNA aus Zellen mit TRIzol® | 61 |
| 2.2.4.3.1.2 | Isolation von RNA aus Geweben mit TRIzol®..... | 62 |
| 2.2.4.3.2 | Reverse Transkription..... | 62 |
| 2.2.4.3.3 | Semiquantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion | 63 |
| 2.2.4.3.4 | Primertest für die semiquantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion... | 65 |
| 2.2.5 | Arbeiten mit Proteinen | 65 |
| 2.2.5.1 | Proteinextraktion..... | 65 |
| 2.2.5.1.1 | Proteinextraktion aus Zellen | 65 |
| 2.2.5.1.2 | Proteinextraktion aus Gewebe | 66 |
| 2.2.5.2 | BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung | 66 |
| 2.2.5.3 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese..... | 67 |
| 2.2.5.4 | Western Blotting | 68 |
| 2.2.5.5 | Antikörperfärbung spezifischer Proteine | 68 |
| 2.2.5.6 | Coomassie-Färbung unspezifischer Proteine..... | 68 |
| 2.2.5.7 | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 69 |
| 2.2.6 | Messung von Triglyzeriden in Seren und Leberlysaten | 70 |
| 2.2.7 | Messung von Cholesterin in Seren und Leberlysaten | 70 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| 2.2.8 | Messung des oxidativen Stresses in der Leber..... | 70 |
| 2.2.9 | Histologische Untersuchung | 71 |
| 2.2.9.1 | Hämalaun-Eosin-Färbung..... | 71 |
| 2.2.9.2 | Sirius-Red-Färbung | 72 |
| 2.2.9.3 | Immunhistochemische Färbung | 72 |
| 2.2.9.4 | Immunfluoreszenzfärbung | 73 |
| 2.2.10 | Statistische Auswertung | 74 |
| 3 | Ergebnisse | 75 |
| 3.1 | SNTA in der humanen Leber | 76 |
| 3.1.1 | SNTA-Expression in der NAFLD..... | 76 |
| 3.1.1.1 | Hepatische SNTA-mRNA-Expression in Korrelation zu verschiedenen Parametern..... | 76 |
| 3.1.1.2 | Hepatische SNTA-mRNA-Expression in Korrelation zu Charakteristika der NASH | 77 |
| 3.1.1.3 | Hepatische SNTA-mRNA-Expression bei Komorbiditäten der NAFLD | 78 |
| 3.1.1.4 | Korrelation zwischen der SNTA-, der SR-BI- und der MnSOD-mRNA-Expression..... | 81 |
| 3.1.2 | SNTA-Expression im HCC..... | 83 |
| 3.2 | Syntrophine in der murinen Leber | 84 |
| 3.2.1 | Syntrophine in der murinen NASH | 84 |
| 3.2.1.1 | MCD-Diät und die Effekte des SNTA-Knockouts | 86 |
| 3.2.1.1.1 | Der Gewichtsverlust ist in den SNTA-Knockout-Tieren geringer | 87 |
| 3.2.1.1.2 | Der Lipidmetabolismus wird durch den SNTA-Knockout verändert..... | 89 |
| 3.2.1.1.2.1 | Steatosegrad | 90 |
| 3.2.1.1.2.2 | Fettsäuresynthese | 91 |
| 3.2.1.1.2.3 | Cholesterinmetabolismus..... | 92 |
| 3.2.1.1.3 | Schutz vor einer hepatischen Entzündung durch den SNTA-Knockout..... | 94 |
| 3.2.1.1.4 | Schutz vor entstehender Fibrose durch den SNTA-Knockout | 96 |
| 3.2.1.1.5 | Schutz vor oxidativem Stress durch den SNTA-Knockout..... | 98 |
| 3.2.1.2 | MCD-Diät und die Effekte des SNTB2-Knockouts | 99 |
| 3.2.1.2.1 | Der Gewichtsverlust wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert..... | 99 |
| 3.2.1.2.2 | Die Entzündung wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert | 101 |
| 3.2.1.2.3 | Die Fibrose wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert | 101 |
| 3.2.1.2.4 | Der Oxidative Stress wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert | 102 |
| 3.2.1.3 | Paigendiät und die Effekte des SNTA-Knockouts | 103 |
| 3.2.1.3.1 | Die Gewichtszunahme wird durch den SNTA-Knockout teilweise reduziert | 103 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| 3.2.1.3.2 | Der Lipidmetabolismus wird durch den SNTA-Knockout nicht verändert... | 104 |
| 3.2.1.3.2.1 | Steatosegrad | 104 |
| 3.2.1.3.2.2 | Fettsäuresynthese | 105 |
| 3.2.1.3.2.3 | Cholesterinmetabolismus..... | 106 |
| 3.2.1.3.3 | Die Entzündung wird durch den SNTA-Knockout nicht verändert | 107 |
| 3.2.1.3.4 | Die Fibrose wird durch den SNTA-Knockout nicht verändert | 109 |
| 3.2.1.3.5 | Der oxidative Stress wird durch den SNTA-Knockout reduziert | 109 |
| 3.2.2 | SNTA in der murinen Fettleber | 110 |
| 3.2.2.3 | Die Insulin Response wird durch den SNTA-Knockout verbessert..... | 110 |
| 3.2.2.4 | Differenziell exprimierte Gene in der Leber der SNTA-Knockout-Tiere | 113 |
| 3.2.2.4.1 | Verifizierung der differenziell exprimierten Gene im Hochfettdiät-Modell... | 113 |
| 3.2.2.4.2 | Analyse der differenziell exprimierten Gene im MCD-Diätmodell | 115 |
| 3.2.2.4.3 | Analyse der differenziell exprimierten Gene im Paigendiät-Modell..... | 116 |
| 3.2.2.4.4 | Analyse der differenziell exprimierten Gene nach SNTA-Knockdown | 117 |
| 3.3 | TUBA8 in der murinen Leber | 118 |
| 3.3.1 | Die TUBA8-Expression in murinen Geweben | 118 |
| 3.3.2 | Expression und Lokalisation von TUBA8 in der humanen und murinen Leber | 119 |
| 3.3.3 | TUBA8 im humanen HCC..... | 121 |
| 3.3.4 | TUBA8- und SNTA-Expression in der murinen NAFLD..... | 122 |
| 3.3.5 | TUBA8- und SNTA-Protein-Interaktion <i>in vitro</i> | 125 |
| 4 | Diskussion | 129 |
| 4.1 | SNTA in der humanen NAFLD..... | 130 |
| 4.1.1 | Negative Korrelation zwischen SNTA-mRNA-Expression und Charakteristika der NASH | 130 |
| 4.1.2 | Positive Korrelation zwischen SNTA und SR-BI, einem wichtigen Protein des Cholesterintransports..... | 131 |
| 4.1.3 | Keine Korrelation zwischen SNTA und MnSOD, einem antioxidativem Protein | 132 |
| 4.1.4 | Expression von SNTA ist im HCC unverändert | 132 |
| 4.2 | Syntrophine in der murinen NAFLD | 133 |
| 4.2.1 | SNTA in der murinen NASH | 133 |
| 4.2.1.1 | Analyse der Fettgewebe der SNTA-Knockout-Mäuse in der NASH | 133 |
| 4.2.1.2 | Analyse des hepatischen Lipidmetabolismus der SNTA-Knockout-Mäuse in der NASH | 134 |
| 4.2.1.3 | Einfluss des SNTA-Knockouts auf Merkmale der NASH | 135 |
| 4.2.1.3.1 | Entzündung | 135 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 4.2.1.3.2 | Fibrose | 136 |
| 4.2.1.3.3 | Oxidativer Stress | 137 |
| 4.2.1.4 | SNTA-Defizienz schützt vor den Folgen der Methionin-Defizienz | 137 |
| 4.2.2 | SNTB2 in der murinen NASH | 137 |
| 4.2.3 | SNTA in der murinen Fettleber | 138 |
| 4.3 | Differenziell exprimierte Gene in den Lebern der SNTA-Knockout-Tiere... | 139 |
| 4.3.1 | Einfluss verschiedener Gene auf Parameter der NAFLD | 139 |
| 4.3.2 | TUBA8..... | 141 |
| 4.3.2.1 | TUBA8 ist in der NAFLD und im SNTA-Knockout differenziell exprimiert.. | 142 |
| 4.3.2.2 | Expression und Lokalisation von TUBA8 in hepatischen Sternzellen | 143 |
| 4.3.2.3 | Expression von TUBA8 in verschiedenen hepatischen Zelllinien | 143 |
| 4.3.2.4 | Expression von TUBA8 ist im humanen HCC erhöht | 144 |
| 4.3.2.5 | TUBA8 als neuer Interaktionspartner von SNTA..... | 145 |
| 5 | Zusammenfassung | 147 |
| 6 | Anhang | 150 |
| 6.1 | Publikationen | 151 |
| 6.1.1 | Erstautorenschaften..... | 151 |
| 6.1.2 | Koautorenschaften | 151 |
| 6.2 | Kongressbeiträge | 153 |
| 6.2.1 | Vorträge..... | 153 |
| 6.2.2 | Poster | 153 |
| 6.3 | Abbildungsverzeichnis | 154 |
| 6.4 | Tabellenverzeichnis | 156 |
| 6.5 | Abkürzungsverzeichnis | 157 |
| 6.6 | Literaturverzeichnis..... | 160 |
| 6.7 | Danksagung | 171 |

1 Einleitung

1.1 Funktionen und Aufbau der Leber

Die Leber ist das größte innere Organ des menschlichen Körpers und spielt beim Stoffwechsel eine zentrale Rolle. Alle aus dem Dünndarm resorbierten Nahrungsbestandteile werden, vor der Zufuhr in den allgemeinen Kreislauf, über den Pfortaderkreislauf zur Leber transportiert [1]. Dort werden die einzelnen Elemente der Nahrung metabolisiert und toxische Stoffe entgiftet [2]. Zusätzlich werden in der Leber, zur Aufnahme der hydrophoben Fette, Gallensäuren produziert [3, 4], welche in der Gallenblase gespeichert werden können. Bei Bedarf können diese, zur Emulsion der Fette und zur leichteren Resorption der Nährstoffe, in das Darmlumen des Duodenums über extrahepatische Gallengänge abgegeben werden [5]. Im Verdauungstrakt werden die Gallensäuren zum Teil ausgeschieden oder wieder rückresorbiert und zur Leber transportiert, in der sie durch eine negative Rückkopplung die Inhibierung der Gallensäuresynthese bewirken [6]. Weitere Aufgaben der Leber neben den Stoffwechselprozessen, der Entgiftung und der Gallensäurenproduktion ist die Hormonproduktion, die Plasmaproteinsynthese und der Lipidmetabolismus [7]. Dabei steht die *de novo* Lipogenese [8], der Fettsäureabbau durch die β -Oxidation [9], die Cholesterinbiosynthese [10], wie auch die Aufnahme und Abgabe von Cholesterin im Vordergrund. Zusätzlich gilt die Leber auch als Speicherort für Vitamine, Glykogen und Eisen [11, 12]. Die in der Leber lokalisierte Glukoneogenese sowie die Glykogenolyse werden bei einem zu niedrigen Blutzuckerspiegel aktiviert um die Blutglukose konstant zu halten [13, 14].

Aufgebaut ist die Leber aus vier Leberlappen. Den zwei großen Leberlappen *Lobus dexter* und *Lobus sinister*, und den zwei kleinen Leberlappen *Lobus quadratus* sowie *Lobus caudatus*. Die Leber wird zum einem mit nährstoffangereichertem Blut vom Darm von außen nach innen durchströmt. Andererseits müssen die in der Leber gebildeten Stoffe wie die Gallensäuren von innen nach außen transportiert werden. Mikroskopisch gliedern sich die Zellen in polygonale, in Strängen angeordnete, 1-2 mm große, sogenannte Läppchen [15]. Im Zentrum eines jeden Läppchens befindet sich die Zentralvene (*V. centralis*), in die das Pfortaderblut, angereichert mit Nährstoffen, von außen kommend durch die Lebersinusoide fließt. Dabei werden die Nahrungsbausteine im Disse'schen Raum, der sich zwischen den Endothelzellen der Sinusoide und den Hepatozyten befindet, aufgenommen und weiter synthetisiert. Zwischen den Hepatozyten befinden sich kleine Spalträume, die sogenannten Gallenkapillaren, in welche die Gallensäuren sekretiert werden [5]. Diese münden dann in größere Gallengänge, die bis zur Gallenblase oder dem Duodenum führen [16].

Im zellulären Aufbau besteht die gesunde Leber zu 80 % aus Hepatozyten. Die restlichen 20 % der Zellen stellen Kupffer-Zellen, hepatische Sternzellen und Endothelzellen dar. Die Kupffer-Zellen befinden sich an der Innenwand der Sinusoide und ragen mit ihren sternförmigen Fortsätzen in den Disse'schen Raum hinein. Durch ihre Lage können sie als sessile Makrophagen der Leber körperfremde und immunreaktive Strukturen, die vom gastrointestinalen Trakt in den Körper gelangen, erkennen und phagozytieren [17]. Die Sternzellen befinden sich direkt im Disse'schen Raum und fungieren als Vitamin A Speicher. Darüber hinaus sind sie auch an der Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt [18, 19]. Während krankhafter Prozesse werden die Sternzellen aktiviert, was zur Proliferation und der übermäßigen Produktion von Kollagen führt. Dieses lagert sich in der Leber ab und stört die zellulären Prozesse, was letztendlich zur Leberfibrose bzw. -zirrhose führen kann. [20].

1.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD)

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die Hauptursache für chronische Lebererkrankungen und wird oft als „die hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms“ bezeichnet [21]. Risikofaktor für die NAFLD ist Übergewicht, welches aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen der Energieaufnahme und des Energieverbrauchs entsteht. Diese nicht benötigte Energie wird in Form von Triglyzeriden zuerst in den Adipozyten gespeichert und, wenn deren Kapazität überschritten wird, in verschiedenen Organen des Körpers, wie der Leber, abgelegt – es kommt zu einer Verfettung der Leber [22].

1.2.1 Spektrum der NAFLD

Die NAFLD umfasst ein Spektrum von vier Lebererkrankungen, die progredient ineinander übergehen. Am Anfang steht dabei eine Lebersteatose mit einem Fettanteil zwischen 5 bis 10 % des Lebergewichts. Aus der Lebersteatose kann sich eine nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) entwickeln, die mit Entzündung und möglicherweise Fibrose einhergeht. Die Lebenserwartung bei Patienten mit einer hepatischen Steatose bleibt, im Gegensatz zu der verkürzten Lebenserwartung bei Patienten mit einer NASH, unverändert [23]. Die Lebersteatose als auch die NASH sind reversibel und können durch eine gesunde Ernährung und Verminderung des Körpergewichts (siehe 1.2.5) vollkommen ausgeheilt werden. Aus einer NASH kann sich aber auch eine Zirrhose, mit einem hohen Risiko für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC),

entwickeln. Dabei kann ein HCC auch in der nicht-fibrotischen NASH Leber entstehen. Diese Ausprägungen der NASH sind irreversibel (siehe Abbildung 1) [24-26].

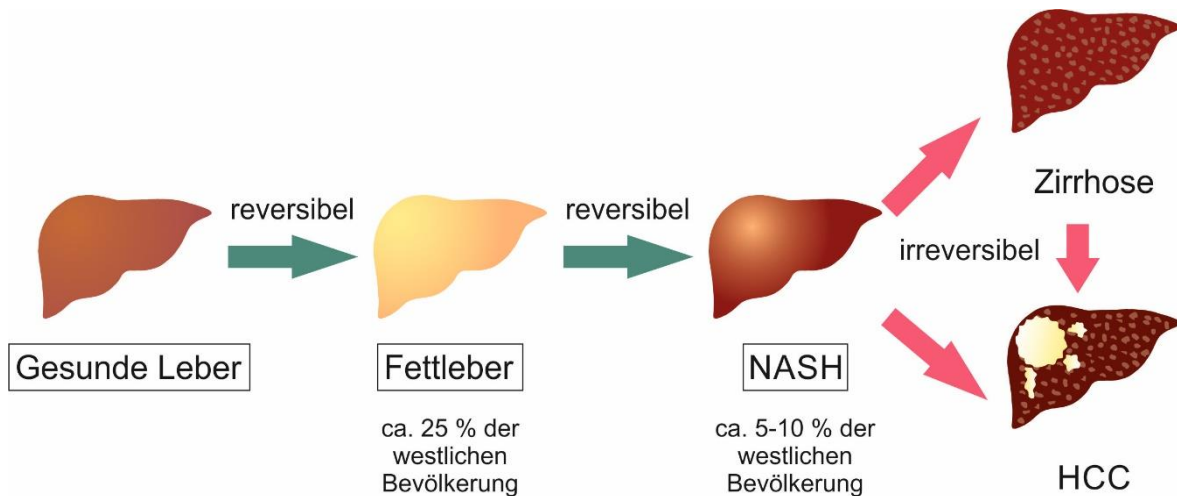


Abbildung 1: Spektrum der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) (nach [24-26]). Die NAFLD beinhaltet die Fettleber, die sich reversibel aus einer gesunden Leber entwickeln kann. Aus einer Fettleber kann wiederum reversibel eine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) entstehen, die mit Entzündung und eventuell Fibrose einhergeht. Dabei sind ca. 25 % der westlichen Bevölkerung von einer Fettleber und 5-10 % von einer NASH betroffen. Als irreversiblen Zustand kann die NASH direkt, oder über die Zirrhose in ein hepatozelluläres Karzinom (HCC) übergehen.

1.2.2 Prävalenz der NAFLD

Von ca. 25 % der westlichen Bevölkerung, die eine Lebersteatose besitzen, entwickelt etwa ein Drittel davon eine NASH (siehe Abbildung 1) [26]. Dabei besteht eine direkte Assoziation zwischen der NAFLD, dem Übergewicht ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) [22] und dem metabolischen Syndrom (Kombination von Hypertonie, Insulinresistenz, abdomineller Adipositas und Dyslipidämie) [27]. Übergewicht ist ein weltweites Problem der westlichen Gesellschaft. Laut einer DEGS (Deutsche Epidemiologische Gesundheitssurvey) Studie von 2012 sind zwei Drittel (67 %) aller Männer und die Hälfte (53 %) aller Frauen in Deutschland übergewichtig [28]. Weltweit leiden ca. 1,5 Milliarden Menschen an Übergewicht [29]. Ein Viertel der Erwachsenen (23 % der Männer und 24 % der Frauen) sind sogar mit einem BMI über 30 kg/m^2 stark adipös [28]. In den USA stieg die NAFLD als Ursache für chronische Lebererkrankungen innerhalb von 20 Jahren von 47 % auf 75 % an, wobei sich die Prävalenz der Adipositas im selben Zeitraum von 21 % auf 33 % erhöhte [21]. Zusätzlich zum BMI spielen aber auch das Alter, das Geschlecht und der ethnische Hintergrund eine Rolle in der Entwicklung einer NAFLD [29].

1.2.3 Pathogenese der NAFLD – eine multifaktorielle Erkrankung

Zur Entstehung der NAFLD wurde die anfängliche *two-hit* Theorie [30, 31] im Jahr 2010 durch das *multiple-hit* Modell abgelöst [32]. Danach tragen verschiedene, teilweise parallel ablaufende, Vorgänge im Körper zur Pathogenese der NAFLD bei. Dazu gehören die Insulinresistenz, die Fettgewebisdysfunktion, das Darmmikrobiom und genetische Faktoren [26]. In Abbildung 2 ist die *multiple-hit* Pathogenese der NAFLD schematisch dargestellt.

1.2.3.1 Insulinresistenz

Bei einer Insulinresistenz ist die Wirkung des Hormons Insulin, welches von den β -Zellen des Pankreas gebildet wird, beeinträchtigt. Die Hauptaufgabe des Insulins ist es den Blutzuckerspiegel, der durch die Aufnahme von Nahrung ansteigt, wieder zu senken. Insulin wird abhängig von der extrazellulären Glukosekonzentration sekretiert und stimuliert die Glukoseaufnahme in die Zellen [33]. Dort wird die Glukose zur Energiegewinnung der Glykolyse zugeführt oder zur Speicherung in Glykogen metabolisiert [34]. Bei der NAFLD liegt eine Insulinresistenz sowohl in den Adipozyten, den Muskelzellen wie auch den Hepatozyten vor und steigert sich durch das Fortschreiten der Erkrankung. Daher zeigen nicht-diabetische Patienten bei einer Steatose eine bessere Insulinsensitivität als beim Vorliegen einer NASH [35, 36]. Die Insulinresistenz, als einer der multiplen Faktoren der NAFLD-Pathogenese, entsteht aufgrund der mit der NAFLD einhergehenden Fettleibigkeit und begünstigt die Entstehung von oxidativem Stress, die Aktivierung der Entzündungssignalwege und die Lipotoxizität [37].

Bei oxidativem Stress ist das Level reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche durch sauerstoffabhängige Redoxreaktionen entstehen, erhöht. Aufgrund der vermehrten hepatischen Lipide kann es zu einer Dysfunktion der Atmungskette in den Mitochondrien kommen, wodurch die β -Oxidation der Fettsäuren gestört wird und ROS überproduziert werden [38]. Die gestörte β -Oxidation trägt dabei wiederum zur Lipidakkumulation in der Leber und dadurch zur Steatose bei [39]. In einer lipidreichen Umgebung induzieren ROS die Lipidperoxidation, wodurch hoch-reaktive Derivate, wie das Malondialdehyd, welches als Marker für oxidativen Stress gemessen werden kann (siehe 2.2.8), gebildet werden [40]. Neben diesen funktionellen Änderungen kommt es auch zu strukturellen Veränderungen der Mitochondrien, wie dem Abbau mitochondrieller DNA und morphologischen Aberrationen [41]. Durch die Zerstörung der mitochondriellen DNA mittels der Produkte des oxidativen Stresses wird die mitochondrielle Atmungskette weiter

geschädigt, was wiederum die Bildung von ROS begünstigt [42]. Ein Teufelskreis entsteht. Die mitochondrielle Dysfunktion wird als Schlüsselement, wenn nicht sogar als der entscheidende Faktor in der Entstehung der NASH postuliert [38]. Bei NASH-Patienten ist daher die Konzentration der hepatischen mitochondriellen DNA [43] wie auch die Aktivität der verschiedenen Enzymkomplexe der Atmungskette reduziert [44]. Zusätzlich führt oxidativer Stress in der Zelle zur Induktion von Zytokinen, wie TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) und IL-6 (*Interleukin 6*), welche eine wichtige Rolle bei der Apoptose, der Entzündung und der Fibrose spielen [26, 45, 46].

Die hepatozelluläre Lipotoxizität, welche auch durch eine Insulinresistenz gefördert wird, entsteht vor allem durch freie Fettsäuren in der Leber. Freie Fettsäuren gelangen entweder über die Nahrung, die Lipolyse im Fettgewebe oder die *de novo* Lipogenese in die Hepatozyten. Zum einen ist in der NAFLD generell das Level der freien Fettsäuren im Serum aufgrund von Übergewicht und der hyperkalorischen Nahrung stark erhöht und wird dadurch der Leber zugeführt [47]. Gleichzeitig steigt die Lipolyse aufgrund der erreichten Speicherkapazität im Fettgewebe an [29]. Zusätzlich dazu wird die *de novo* Lipogenese durch die Insulinresistenz getriggert. Die Hyperinsulinämie, die aufgrund der Insulinresistenz entsteht, um der Hyperglykämie entgegenzuwirken, steigert die *de novo* Lipogenese in der Leber und somit den Grad der Steatose [48, 49]. Da die freien Fettsäuren infolge dieser Parameter im Übermaß in der Leber vorhanden sind, wirken diese hepatotoxisch, indem sie einen Stress im endoplasmatischen Retikulum induzieren und dadurch der Signalweg der Apoptose angeschaltet wird [50]. Auch der oxidative Zellstress trägt zu einer gestörten Homöostase in diesem Organell bei [51]. Durch die Dysfunktion des endoplasmatischen Retikulums akkumulieren *unfolded proteins*, welche durch ihre fehlerhafte Faltung den Metabolismus im endoplasmatischen Retikulum stören. Durch die Aktivierung des UPR (*unfolded protein response*) wird versucht, über die Bildung von Chaperonen, die für die korrekte Proteinfaltung zuständig sind, die normale Zellfunktion wiederherzustellen [52]. Zusätzlich wird auch die Translation reduziert und die Proteindegradation aktiviert [53]. Wenn der Stress im endoplasmatischen Retikulum nicht verbessert werden kann und die Schädigung zu weitläufig ist, wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Dazu werden JNK (*c-jun N-terminal kinase*) aktiviert, welche die Entzündung stimulieren und die Apoptose einleiten. Daher ist die Aktivität der JNK in der Leber von NASH-Patienten im Vergleich zu Individuen mit einer benignen Steatose erhöht [54]. Der Stress im endoplasmatischen Retikulum scheint also ein entscheidender Wendepunkt in der Entwicklung der NAFLD zu sein. Daher gilt die Lipoapoptose als ein

elementarer Prozess in der Pathogenese der NAFLD und korreliert mit Entzündung und Fibrose [55].

1.2.3.2 Dysfunktion des Fettgewebes

Das Fettgewebe reguliert als Lipidspeicher und endokrines Organ verschiedenste Prozesse. Dessen Dysfunktion stellt eine weitere der multifaktoriellen Ursachen der NAFLD-Pathogenese dar [26, 56]. Ein Übermaß an Triglyzeriden wird zuerst in den Adipozyten gespeichert, was zu einer Hypertrophie und Insulinresistenz der Zellen führt. Diese hypertrophen Adipozyten sezernieren Zytokine und Chemokine, wodurch Makrophagen einwandern, welche wiederum inflammatorische Stoffe freisetzen. Zusätzlich werden inflammatorische und profibrotische Adipokine wie Leptin vermehrt gebildet, während antiinflammatorische Proteine wie Adiponektin verringert werden [57]. Diese Kaskade führt zur Entzündung des Fettgewebes, welches sich negativ auf die Leber auswirkt und dort die Entzündung und Fibrose fördert [58].

1.2.3.3 Darmmikrobiom

Einen weiteren Faktor der *multiple-hit* Hypothese stellt das durch die ungesunde Ernährung veränderte Darmmikrobiom dar. Es ist bekannt, dass das Darmmikrobiom eine entscheidende Rolle in vielen verschiedenen Krankheiten wie kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes und auch der NAFLD spielt [59]. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben gelangen Nährstoffe vom Dünndarm über die Pfortader vorerst in die Leber. Normalerweise können toxische Bestandteile der Darmflora über diesen Weg nicht in den Körperkreislauf übertreten. Bei einer NAFLD ist aber die Permeabilität des Intestinums aufgrund defekter interzellulärer *tight junctions* erhöht, wodurch auch Endotoxine wie LPS (Lipopolysaccharid), welche Bestandteile der bakteriellen Darmflora sind, in die Leber gelangen können [60]. Es besteht sogar eine Korrelation zwischen der Permeabilität des Darms und dem Stadium der NAFLD-Erkrankung [60, 61]. Zu der Dysfunktion des Darms kommt eine mögliche Dünndarmfehlbesiedlung, auch SIBO (*small intestinal bacterial overgrowth*) genannt, die bei NAFLD-Patienten vermehrt vorliegt [62, 63]. Dabei steigt die normalerweise eher bakterienarme Dünndarmbesiedlung von 10^3 Bakterien pro Milliliter auf 10^5 bis 10^6 Bakterien pro Milliliter an, wobei die Bakterien hauptsächlich aus dem Dickdarm stammen und die natürliche Dünndarmflora verdrängen [64, 65]. Die körperfremden Strukturen der Bakterien, die auf diesem Wege in die Leber gelangen,

werden dort erkannt und lösen eine Immunantwort aus, indem proinflammatorische Zytokine sezerniert werden.

Aufgrund einer kalorien- und fettreichen Ernährung kann es auch zu Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora kommen [66]. Dabei tritt vor allem eine Bakteriengattung vermehrt auf, welche Cholin, einen essentiellen Bestandteil des Membranlipids Phosphatidylcholin (wiederum Bestandteil von VLDL), aus der Nahrung zu Methylamin umwandelt [67]. Dadurch wird die NAFLD auf zwei Weisen gefördert. Zum einen werden die toxischen Amine von der Leber aufgenommen und zu Trimethylamin-N-oxid konvertiert, welches proinflammatorisch wirkt [68]. Zum anderen entsteht durch die Umsetzung von Cholin durch die Mikrobiom Dysbiose eine Cholin-Defizienz für den Körper, wodurch der Transport von Triglyzeriden über VLDL von der Leber in den Kreislauf gestört wird [69, 70].

1.2.3.4 Genetische Faktoren

Alle bis jetzt erwähnten Faktoren in der *multiple-hit* Pathogenese der NAFLD wie der oxidative Stress, die Zytokin-Expression, die Reaktion auf Endotoxine und der hepatische Metabolismus der freien Fettsäuren sind durch genetische Varianz beeinflussbar [71]. Daher spielen auch genetische Faktoren in der NAFLD-Pathogenese eine wichtige Rolle und wirken auf den Verlauf der Erkrankung ein.

Genomweite Assoziationsstudien haben gezeigt, dass Polymorphismen im PNPLA3 (*patatin-like phospholipase 3*) Gen mit der Entstehung und der Progression der NAFLD assoziiert sind [72, 73]. PNPLA3 ist eine Lipase, welche die Triglyzeride in Adipozyten hydrolysiert [74]. Zusätzlich wurde eine Assoziation einer PNPLA3 Sequenzvariante mit einer Erhöhung der systemischen Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) -klinische Marker der Leberschädigung (siehe 1.2.41.2.4)-gezeigt [74]. Eine Studie von Liu *et al.* wies eine signifikante Assoziation zwischen einem PNPLA3 Polymorphismus und dem Risiko an einer NAFLD bzw. NASH zu erkranken nach [75].

Ein weiteres Gen mit einer Rolle in der Pathogenese der NAFLD ist TM6SF2 (*transmembrane 6 superfamily member 2*), welches an der VLDL Sekretion beteiligt ist. [76, 77]. Hierbei wurde eine Assoziation eines Polymorphismus mit der hepatischen Steatose sowie erniedrigtem VLDL-Serumlevel beschrieben [78].

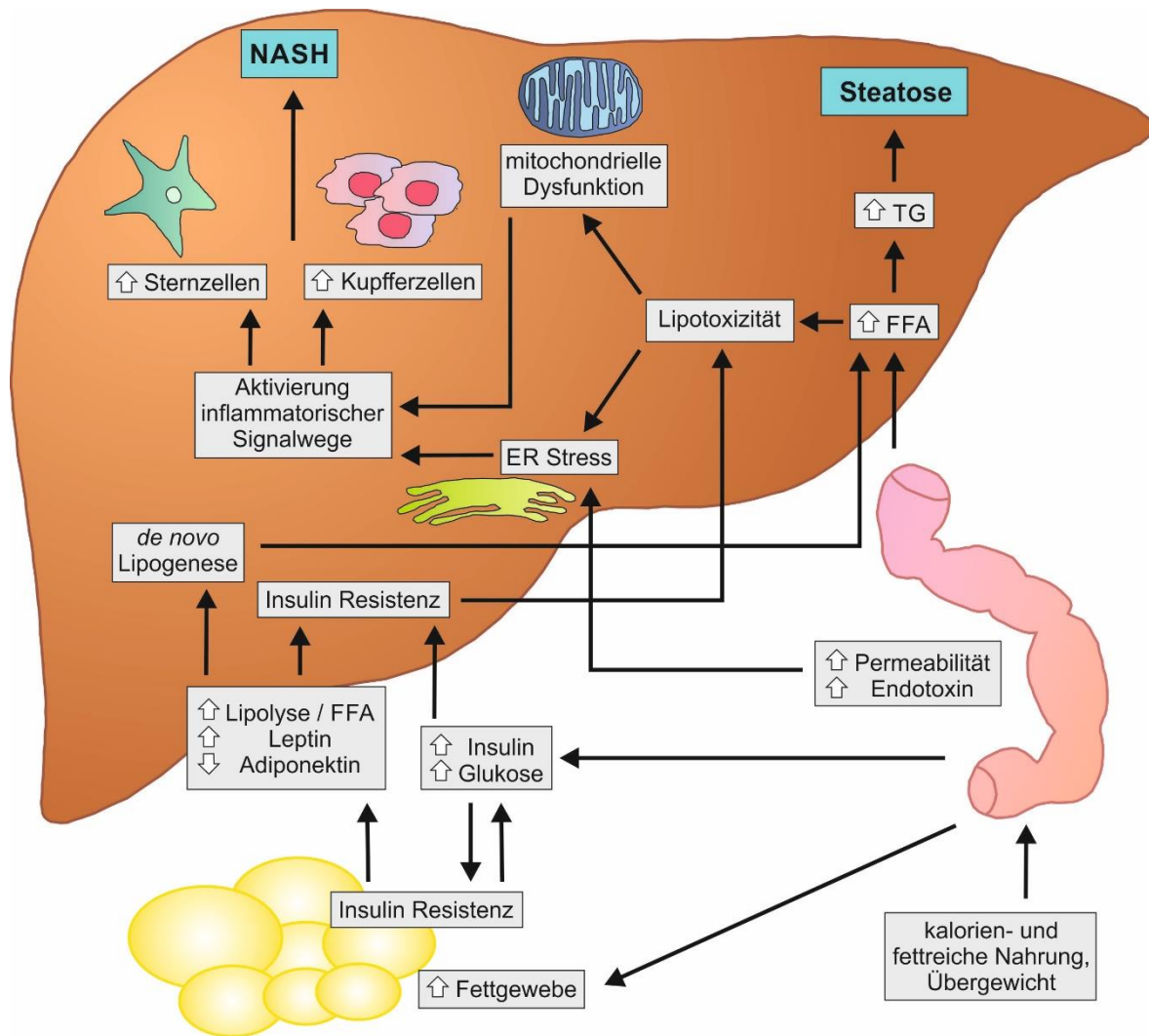


Abbildung 2: NAFLD-Pathogenese nach der *multiple-hit* Hypothese (nach [26, 29]). Kalorien- und fettreiche Nahrung, die mit Übergewicht einhergeht, führt aufgrund eines erhöhten Glukose- und dadurch auch Insulinlevels zur Insulinresistenz im Fettgewebe sowie in der Leber. Zusätzlich entsteht durch die übermäßige Speicherung der Triglyzeride (TG) eine Hypertrophie des Fettgewebes und dadurch eine Dysfunktion, welche mit einer gesteigerten Lipolyse, der vermehrten Sekretion verschiedener proinflammatorischer Adipokine und einer verminderten Ausschüttung des antiinflammatorischen Adiponektins assoziiert ist. Diese Veränderungen des Fettgewebes führen wiederum zur erhöhten Triglyzeridsynthese in der Leber. Das Übermaß an freien Fettsäuren (FFA), welches durch die fettreiche Nahrung, die Lipolyse im Fettgewebe und die hepatische *de novo* Lipogenese zustande kommt, wird als Triglyzeride in der Leber gespeichert, wodurch eine Steatose entsteht. Des Weiteren bedingt das Überangebot an freien Fettsäuren eine Lipotoxizität, welche wiederum zur mitochondrialen Dysfunktion und Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) beiträgt. Durch diese Störungen der Homöostase der Organellen werden inflammatorische Signalwege angeschaltet, die eine Aktivierung der Kupfer-Zellen (Makrophagen der Leber) und eine Vermehrung der hepatischen Sternzellen auslöst. Die NASH entsteht und geht mit Entzündung und Fibrose einher. Die schlechte Ernährung bewirkt zusätzlich eine Dysfunktion des Dünndarms, wodurch toxische Endotoxine in die Leber gelangen und einen weiteren Beitrag zur Aktivierung der inflammatorischen Signalwege leisten.

1.2.4 Diagnose der NAFLD

Eine der Schwierigkeiten bei der Diagnose der NAFLD ist die Schmerzunempfindlichkeit der Leber. Die NAFLD läuft in ihrem frühen Stadium meist asymptomatisch ab und wird daher oft erst sehr spät diagnostiziert [79]. Sie wird lediglich als ein leicht unangenehmes Gefühl im oberen linken Quadranten des Abdomens beschrieben [80]. Ein Verdacht auf eine NAFLD geschieht aufgrund der Erfüllung mindestens eines Parameters des metabolischen Syndroms [22]. Des Weiteren können erhöhte Serumspiegel der Transaminasen AST und der ALT einen Hinweis auf eine NAFLD Erkrankung geben [81]. Diese, vor allem bei Lebererkrankungen erhöhten, Proteine sind im Normalfall nur sehr gering im Blut vorhanden (Männer: < 50 [U/l], Frauen: < 35 [U/l]) und treten bei einer Leberschädigung wie einer Hepatitis aus der Leber in das Blut über.

Zusätzlich können auch Leberscans als nicht invasive Methode weitere Hinweise für die Diagnose geben. Zum Scannen der Leber stehen der klassische Ultraschall, die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) zur Verfügung, wodurch Fettablagerungen in der Leber detektiert werden können. Der Ultraschall liegt dabei bei einer Sensitivität von 60 bis 94 %, welche aber bei geringerem Steatosegrad stark abnimmt [82, 83]. Das CT und das MRT weisen eine ähnliche Sensitivität auf [84]. Die hepatische Fibrose kann über die Elastographie bestimmt werden [85, 86]. Hierbei wird die Elastizität und die Verformbarkeit der Leber gemessen, die, je stärker die hepatische Fibrosierung fortgeschritten ist, geringer ausfällt [86].

Die Leberbiopsie ist, wenn auch mit dem Nachteil der invasiven Methode, der beste Weg eine NAFLD zu diagnostizieren. Dabei kann histologisch der Steatosegrad, der Entzündungsgrad, das *Ballooning* und der Fibroseggrad am sichersten bestimmt werden [83]. Über ein Scoring-System der *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* können die Patienten in einem NASH-Score von 0 - 5 einheitlich bewertet werden (siehe 2.2.1.1) [87].

1.2.5 Behandlung der NAFLD

Die bisher einzige Therapie, die einer Fettleber bis hin zu einer NASH entgegenwirken kann, ist das Umstellen des Lebensstils und der Ernährung [88]. Durch eine Gewichtsreduktion aufgrund einer ausgewogenen Ernährung und einer Bewegungssteigerung kann eine NASH geheilt werden [89-91]. In einer amerikanischen Studie von 2010 wurden die Effekte einer Diät zusammen mit Sport auf die NASH untersucht [90]. Dabei wurde festgestellt, dass sich durch eine Gewichtsreduktion von

7 bis 10 % des Körpergewichts innerhalb von 48 Wochen der NASH-Score, der über Biopsie Proben bewertet wurde, drastisch von 4,4 auf 2,0 verbessert hat. Es ergaben sich sowohl signifikante Verbesserungen in der Steatose, wie auch in der Entzündung und der Schädigung der Hepatozyten [90].

Eine medikamentöse Behandlung der NAFLD ist nicht so erfolgversprechend wie die Gewichtsreduktion. Dennoch stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. Zum einen werden oft Antidiabetika, wie Pioglitazon eingesetzt, welche neben ihren positiven Effekten in der Typ-2-Diabetes Erkrankung auch die Steatose und Entzündung in der Leber verbessern [92]. Ein weiteres häufig eingesetztes Medikament in der NAFLD ist Vitamin E [93]. Dies ist ein Antioxidans und soll den oxidativen Stress, der in der Pathologie der NASH maßgeblich ist, reduzieren. In einer Studie von Sanyal *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von NASH-Patienten mit Vitamin E den Steatose- wie auch den Entzündungsgrad reduziert, nicht aber den Fibrosegrad [94]. Weitere Medikamente für die Behandlung der NAFLD werden in aktuellen Studien untersucht und zielen meist, wie auch die Antidiabetika und die Antioxidantien, auf Komorbiditäten oder einzelne Faktoren, die mit der NASH einhergehen, ab. Dazu zählen Lipidsenker, die gegen die Dyslipidämie eingesetzt werden, wie auch entzündungshemmende Medikamente [95, 96].

1.3 Syntrophine

Syntrophine sind membranassoziierte Adapterproteine und wurden 1984 das erste Mal im elektrischen Organ des Torpedorochens entdeckt [97]. Über die Jahre wurden sie dann auch in vielen verschiedenen Säugetiergeweben gefunden [98, 99]. Die Familie der Syntrophine beinhaltet fünf bekannte homologe Isoformen: α 1-, β 1-, β 2-, γ 1- und γ 2-Syntrophin [100-102]. Alle diese Syntrophine haben eine Größe zwischen 55 und 60 kDa und bestehen aus 505 bis 539 Aminosäuren. Das α 1-Syntrophin (SNTA) wird hauptsächlich im Skelettmuskel, dem Herzen und dem Gehirn exprimiert [101, 103]. β 1-Syntrophin (SNTB1) und β 2-Syntrophin (SNTB2) finden sich in fast allen Geweben und werden ubiquitär exprimiert, wobei SNTB2 in hoher Konzentration in der Leber und dem Herzen vorkommt [101]. Dagegen findet die Expression von γ 1-Syntrophin (SNTG1), wie auch von γ 2-Syntrophin (SNTG2), hauptsächlich im Gehirn statt, wobei SNTG2 auch in weiteren Geweben, wie dem Skelettmuskel, der Leber oder den Hoden auftritt [100, 102]. Obwohl die verschiedenen Isoformen in ähnlichen Zellen exprimiert werden, ist ihre intrazelluläre Lokalisation oft unterschiedlich (siehe 1.3.2).

1.3.1 Aufbau und Struktur der Syntrophine

Die Struktur aller Syntrophin Isoformen ist ähnlich. N-terminal befindet sich eine PH1 (*pleckstrin homology*)-Domäne, die durch eine PDZ (*postsynaptic density protein-95/disc-large/zonula occludens-1*)-Domäne gespalten ist. Zentral befindet sich eine weitere PH2 Domäne und der C-Terminus besteht aus einer SU (*syntrophin unique*)-Domäne, die zwischen den verschiedenen Isoformen die größten Unterschiede ausmacht (siehe Abbildung 3) [104]. Zwar besitzt keine dieser Domänen eine eigene enzymatische Funktion, jedoch ist jede einzelne dieser Domänen zur Interaktion mit den unterschiedlichsten Proteinen bestimmt.

1.3.2 Funktionen der Syntrophine

Adapterproteine sind wichtig für die Organisation und Regulation von Signalwegen. Wie auch die Syntrophine besitzen die meisten Adapterproteine mindestens eine, wenn nicht sogar eine Reihe von unterschiedlichen Bindedomänen, um Interaktionen mit verschiedenen Proteinen eingehen zu können. Die eigentliche Funktion der Syntrophine findet sich daher in der zellulären Lokalisation und Funktion der verschiedenen Interaktionspartner [105].

1.3.3 Interaktionspartner der Syntrophine

Die bis jetzt entdeckten und erforschten Interaktionspartner zeigen, dass die Syntrophine eine Rolle in der Skelettmuskelfunktion, bei der Blutdruckregulation und der Lipolyse spielen – und somit auch für das Metabolische Syndrom bzw. die NAFLD-Pathogenese von Bedeutung sein könnten [106]. Einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang der Syntrophine mit dem Stoffwechsel lieferte die reduzierte Expression von SNTA im Muskel von Frauen mit Gestationsdiabetes sowie im Muskel der *non-obese* Goto-Kakizaki Ratte, einem Tiermodell zur Erforschung von Typ-2-Diabetes [107, 108].

1.3.3.1 Interaktion mit dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex

Der bekannteste Interaktionspartner der Syntrophine ist Dystrophin. Alle Syntrophine, außer SNTG2, sind Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes [102, 109, 110] und wurden daher im Muskel sehr gut untersucht. Der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex besteht transmembran aus den Glykoproteinen Sarkoglykan und Dystroglykan, welches an Laminin bindet und dadurch eine Verbindung zur Basallamina, sprich der

extrazellulären Matrix, herstellt. Im Zytosol befinden sich Dystrophin, Dystrobrevin und die Syntrophine. Dabei assoziiert Dystrophin mit Aktin, wodurch eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix entsteht. Im Gegensatz zu anderen Dysfunktionen innerhalb dieses Komplexes (vgl. Muskeldystrophie vom Typ Duchenne/Typ Becker [111]) bewirkt eine SNTA-Defizienz im Mausmodell keine Muskelpathologie. Die einzigen Anzeichen einer Dysfunktion zeigt eine Muskelhypertrophie, eine aberrante Anordnung der neuromuskulären Synapsen und eine Reduktion der Muskelregeneration [112, 113]. Im Bewegungsapparat zeigt die SNTA-Knockout-Maus wie auch die SNTB2-Knockout-Maus keine Probleme [112, 114]. Innerhalb des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes binden die Syntrophine auch an weitere Dystrophin-ähnliche Proteine der postsynaptischen Membran und sorgen für deren Lokalisation und Regulation: Diese sind Dystrobrevin, ein Interaktionspartner von Dystrophin, und Utrophin [110, 114, 115]. Letztere Proteine, wie auch Dystrophin selbst, interagieren mit der PH2-Domäne sowie der SU-Domäne der Syntrophine (siehe Abbildung 3) [110, 116]. Utrophin ist ein Homolog zu Dystrophin und interagiert mit SNTB2 und Aktin. Zusätzlich besteht auch eine Assoziation zwischen Utrophin und den Lipidtropfen in Adipozyten [117]. Diese Zusammenhänge bestärken die Vermutung, dass die Syntrophine eine Rolle im Lipidmetabolismus spielen.

1.3.3.2 Interaktion mit Kanalproteinen

Weitere Interaktionspartner der Syntrophine stellen Kanalproteine dar. Dazu zählen unter anderem Natrium-, Kalium- und Wasserkanäle [118-120]. Dabei interagieren die Natrium- und Kaliumkanäle mit den PDZ-Domänen von SNTA, SNTB1 und SNTB2 [118, 121]. Eine Bindung mit den Wasserkanälen, ebenfalls über die PDZ-Domäne, konnte nur bei SNTA festgestellt werden (siehe Abbildung 3) [122]. Durch die Interaktion zu den Syntrophinen wird die Lokalisation der Kanalproteine in der Plasmamembran reguliert [123]. Welchen Einfluss die Syntrophine in der Funktionalität von Kanalproteinen aufweisen zeigt die Tatsache, dass Mutationen von SNTA beim Menschen zu Dysfunktionen der Natriumkanäle im Herzmuskel führen können, welche als ursächlich für den plötzlichen Kindstod und der Myokardkrankung Long-QT Syndrom gelten [124, 125].

1.3.3.3 Interaktion mit Rezeptoren

Weitere Interaktionen gehen Syntrophine auch mit Rezeptoren, wie den α 1D-adrenergen Rezeptoren, ein, die sie über den Dystrophin-Glykoprotein-Komplex an der

Plasmamembran lokalisieren können [126, 127]. An diesen transmembranen G-Protein gekoppelten Rezeptoren bindet vor allem das Katecholamin Noradrenalin, wodurch der Blutdruck und der Gefäßwiderstand reguliert werden können [128]. SNTA erhöht dabei die Konzentration der α 1D-adrenergen Rezeptoren in den glatten Muskelzellen der Aorta [126] und spielt dadurch eine wichtige Rolle in der Regulation des kardiovaskulären Systems, welches unter anderem beim metabolischen Syndrom gestört ist. Die Interaktion von SNTA, SNTB1 und auch SNTB2 mit den α 1D-adrenergen Rezeptoren erfolgt über deren PDZ-Domäne (siehe Abbildung 3) [127].

Ein weiteres im Hinblick auf den Lipidmetabolismus interessantes Protein, welches mit den PDZ-Domänen von SNTA, SNTB1 und SNTB2 interagiert, ist ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*) (siehe Abbildung 3) [129-131]. ABCA1 ist ein in der Plasmamembran lokalisiertes Transportprotein der Familie der *ATP-binding cassettes*, welche durch die Bindung und Hydrolyse von ATP die Energie für den Transport von Cholesterin und Phospholipide aus der Zelle aufbringen. Es handelt sich dabei um den sogenannten reversen Cholesterinefflux in den Blutstrom. Dabei werden Cholesterin und Phospholipide auf das Apolipoprotein A1 transloziert und dadurch HDL (*high density lipoprotein*), welches Cholesterin aus den peripheren Geweben aufnimmt, gebildet. Durch die Interaktion mit Syntrophin wird ABCA1 stabilisiert und die Cholesterinfreisetzung erhöht [129]. Entsprechend bewirkt eine ABCA1-Defizienz im Mausmodell reduzierte HDL und LDL-Serumlevel [132] sowie ein erhöhtes Risiko für eine Adipositas und Insulinresistenz [133]. Da die hepatische Expression von ABCA1 in SNTA / SNTB2-Knockout-Mäusen nicht reduziert war und der Cholesterinefflux durch den Knockout nicht beeinflusst wird [134, 135], regulieren Syntrophine weder ausschließlich dessen Stabilität noch den Lipidtransport [136]. Die in den SNTA / SNTB2-Knockout-Mäusen verminderte Konzentration von hepatischem Cholesterin und Shingomyelin wie auch die Expression von SR-BI (*scavenger receptor-BI*), welcher an der Cholesterinaufnahme in die Hepatozyten beteiligt ist, lassen sich somit nicht über eine gestörte ABCA1 Funktion erklären [136, 137]. Des Weiteren binden SNTA und SNTB2 nicht an SR-BI, welches durch das PDZ-Protein PDZK1 (*PDZ domain-containing scaffolding protein1*) stabilisiert wird [138].

1.3.3.4 Interaktion mit weiteren Proteinen

Sehr gut untersucht ist die Bindung von SNTA an die nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*) [114, 139, 140]. Diese Muskel-spezifische Isoform der neuronalen NOS reguliert

den Blutfluss während der Muskelkontraktion und ist, wie SNTA, im Muskel von diabetischen Ratten und Frauen mit Gestationsdiabetes erniedrigt exprimiert [107, 141]. Auch im Mausmodell liegt die Expression der muskulären nNOS durch die SNTA-Defizienz reduziert vor [142]. Die Interaktion von SNTA mit nNOS geschieht ebenfalls über die PDZ-Domäne (siehe Abbildung 3) [139].

In Myoblasten stabilisiert SNTA während der Differenzierung die Katalase, wodurch der oxidative Stress vermindert wird [143]. Andere Arbeiten zeigen jedoch eine durch SNTA vermehrte ROS-Generation. Das kleine G-Protein Rac1 (*Rac family small GTPase 1*) wird durch SNTA, aufgrund einer Bindung zwischen SNTA und Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*), ebenfalls einem Adapterprotein [144], aktiviert [145]. Dieser Komplex erhöht die Produktion von ROS und die Migration von Brustkrebszellen [145, 146]. Eine medikamenten-induzierte Depolymerisation des Aktin Zytoskeletts führt zu einer Verminderung der Tyrosin Phosphorylierung im SNTA-Protein. Diese posttranslationale Modifizierung ist an der Aktivierung von Rac1 beteiligt [145]. Folglich bewirkt diese Intervention eine verminderte Zellmigration und ROS-Produktion. Die Zellen werden apoptotisch. Rac1 reguliert die Proliferation und Migration von Zellen und ist somit für die Tumorentstehung und Metastasierung von großem Interesse [147]. Daher ist die Expression von SNTA in verschiedenen Tumoren interessant. Es wurde eine verringerte Expression im Ösophagus-Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom gegenüber den angrenzenden normalen Geweben nachgewiesen [103, 148]. Im Brustkrebs war SNTA erhöht wohingegen sich im Magen, der Lunge, dem Kolon und in rektalen Tumoren keine Unterschiede ergaben [103].

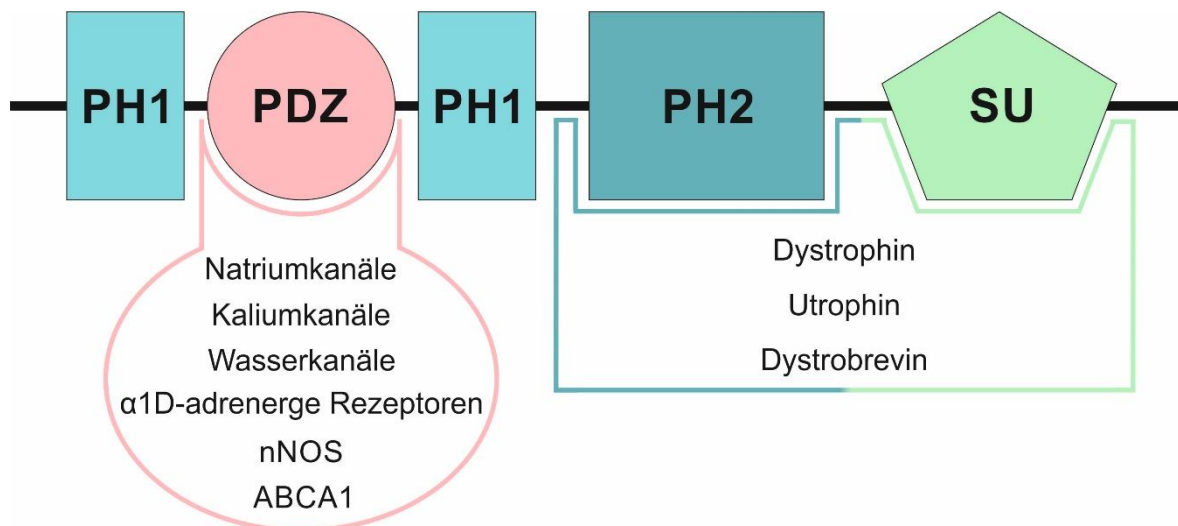


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Syntrophine mit ihren Interaktionspartnern (nach [149]). Die Syntrophine bestehen N-terminal aus einer PH1 (*pleckstrin homology*)-Domäne, die durch eine PDZ (*postsynaptic density protein-95/disc-large/zonula occludens-1*)-Domäne geteilt ist. Mit dieser PDZ-Domäne interagieren Natrium-, Kalium- und Wasserkanäle, wie auch α 1D-adrenerge Rezeptoren, nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*) und ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*). Zentral befindet sich eine weitere PH2-Domäne und C-terminal eine SU (*syntrophin unique*)-Domäne. Mit Hilfe dieser Domänen gehen die Syntrophine Interaktionen mit Dystrophin, Utrophin und Dystrobrevin ein.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die NASH entwickelt sich aus einer Lebersteatose und ist die häufigste Ursache für Lebererkrankungen in westlichen Ländern.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in Hochfettdiät gefütterten Mäusen zeigten, dass SNTA $-/-$ Tiere vor der Lebersteatose geschützt sind. SNTB2 $-/-$ Tiere zeigen diesen Phänotyp nicht, allerdings war hier die Expression von Caveolin-1 verändert. Caveolin-1 ist Bestandteil der sogenannten Caveolae, die für die Signaltransduktion verschiedener Proteine von Bedeutung sind [150]. Syntrophine sind als Adapterproteine zuständig für die Regulation und Lokalisation verschiedener weiterer Proteine [149]. Ihre Funktion für den Stoffwechsel und in der Leber ist bislang jedoch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von SNTA und SNTB2 in der NASH zu untersuchen. Zum einen wurde in einem humanen NAFLD-Kollektiv die Expression von SNTA gemessen und im Hinblick auf verschiedene Komorbiditäten dieser Lebererkrankung analysiert. Mit Hilfe präklinischer Diätmodelle, die das Spektrum der NAFLD von der Lebersteatose bis hin zur NASH mit Entzündung und Fibrose abdecken, wurde die Rolle der Syntrophine für die Pathogenese geklärt. Die NASH wurde mittels der MCD-Diät und der atherogenen Paigendiät sowohl in SNTA $-/-$, als auch in SNTB2 $-/-$ Mäusen induziert und verschiedenste Parameter im Vergleich zu den genotypspezifischen wie auch den

diätspezifischen Kontrollen gemessen und bewertet. Dies beinhaltete vor allem Untersuchungen mit Fokus auf die Fettsäuresynthese, den Cholesterinmetabolismus und den Steatosegrad der Leber. Analysiert wurden auch Marker für die hepatische Entzündung, die Fibrose, den hepatischen oxidativen Stress und die Apoptose. Des Weiteren wurde in SNTA ^{-/-} Mäusen über eine Hochfettdiät eine Adipositas induziert und dabei differenziell exprimierte Gene im Hinblick auf die Diät wie auch dem Genotyp detektiert. Die Genexpression wurde verifiziert und auch in den NASH-Modellen untersucht. Die hepatische Protein-Expression und mögliche SNTA Interaktion eines dieser Gene, TUBA8 (*tubulin alpha 8*), wurden im Detail analysiert. Eventuelle Veränderungen des Insulinsignalweges durch den SNTA-Knockout wurden ebenfalls im Tiermodell der Hochfettdiät geklärt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Geräte

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|--------------------------|
| Autoklav VX-150 | Systemec |
| Brutschrank Heraeus BBD6220 | Thermo Fisher Scientific |
| Brutschrank ORBITAL INCUBATOR S150 | Stuart |
| Camera Controller Digital Sights DS-U1 | Nikon |
| Control Box BX-UCB | Olympus |
| Countess II Automated Cell Counter | Thermo Fisher Scientific |
| Durchlichtmikroskop IL HC komplett | Leica |
| Eismaschine ZBE 70-35 | Ziegra |
| Färbegestell Hecht | Omnilab |
| Feinwaage PLE 200-3 | Kern & Sohn GmbH |
| Foam Pads | Bio-Rad |
| GentleMACS™ Dissociator | Miltenyi Biotec |
| Glaskasten mit Zubehör nach Hauser | Roth |
| Glaskasten Hecht | Omnilab |
| Imaging System ChemiDoc™ XRS+ | Bio-Rad |
| iMark™ Microplate Absorbance Reader | Bio-Rad |
| Kamm für SDS-PAGE, 10-well und 15-well, 1,0 mm | Bio-Rad |
| Kühlplatte CP60 | Microm |
| Kühlzentrifuge 5424 R | Eppendorf |
| Laminar Flow Bench Heraeus HeraSafe | Thermo Fisher Scientific |
| LightCycler® 1.5 Instrument | Roche |
| Magnetrührer MR3000D, MR3001K | Heidolph |
| Membran-Vakuumpumpe N86 KN.18 | KNF |
| Microtom RM 2145 | Leica |
| Mikroskop BX61 | Olympus |
| Mikroskop Eclipse E600 | Nikon |
| Mikroskopsystem DFC 290 | Leica |
| Mikrowelle HF12M240 | Siemens |
| Milli-Q Biocell | Millipore |
| Mini Trans Blot Module | Bio-Rad |
| Mini-PROTEAN Tetra Cell | Bio-Rad |
| Mini-Zentrifuge Sprout™ | Biozym |
| Mr. Frosty Freezing Container | Nalgene |

| | |
|--|----------------------------|
| Multistepper Handystep S | Brand |
| Multistepper Multipette® plus | Eppendorf |
| NanoDrop 2000 Spectrophotometer | Thermo Fisher Scientific |
| Paraffin-Streckbad 1052 | GFL |
| PCR-Cycler T Gradient | Biometra |
| PCR-Cycler T1 Thermocycler | Biometra |
| pH-Meter pH level 1 | InoLab |
| Pipettensatz Research® / Research® plus | Eppendorf |
| Pipettierhilfe Accu-jet | BRAND |
| Pipettierhilfe Easypet | Eppendorf |
| Pipettierhilfe neoPipette Controller | Neolab |
| Plattformschüttler Rotamax 120 | Heidolph |
| Power supply PowerPac 200 | Bio-Rad |
| Power supply PowerPac Basic | Bio-Rad |
| Präparatenmappe mit Deckel | Hartenstein |
| Reflected Fluorescence System U-RFL-1 | Olympus |
| Short Plates | Bio-Rad |
| Sicherheitsabzug | LABCONTROL TROX Technik |
| Sicherheitsspritzflasche | Hartenstein |
| Spacer Plates, 1,0 mm | Bio-Rad |
| Spülmaschine Professional G 7883 CD | Miele |
| Thermoblock TB1 | Biometra |
| Thermomixer comfort / compact | Eppendorf |
| Tischzentrifuge 5415 D | Eppendorf |
| Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 2070 | Bandelin |
| UV-Flächenstrahler UVC 30 | Kendro Laboratory Products |
| Vortex REAX 1 | Heidolph |
| Vortex V1 | IKA |
| Waage 440-45N | Kern & Sohn |
| Waage SC6010 | Scout |
| Wasserbad WNE 14 | Memmert |
| Wide Mini-Sub Cell GT System | Bio-Rad |
| Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R | Thermo Fisher Scientific |

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|----------------------------|
| 96 Well-Platten | Corning |
| Aspirationspipetten, 5 ml | BD |
| Aufbewahrungsdosen | Hartenstein |
| Discardit™ II Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml) | BD |
| Microlance™ 3 Kanülen (18G, 20G, 21G, 27G) | BD |
| Biopsy Punch 6 mm | Stiefel |
| Biosphere-Filterspitzen (20 µl, 1250 µl) | Sarstedt |
| Combitips advanced (2,5 ml, 5 ml, 10 ml) | Eppendorf |
| Countess™ Cell Counting chamber slides | Thermo Fisher Scientific |
| Cryobox | VWR |
| Cryoröhrchen, 2 ml | Corning |
| Deckgläschen Menzel-Gläser 24 x 50 mm | Thermo Fisher Scientific |
| Einweg-Skalpell (#11, #15, #22) | FEATHER |
| Elektrophorese Tips | Bio-Rad |
| Entsorgungsbeutel | VWR |
| epT.I.P.S.® 50 bis 1000 µl | Eppendorf |
| Filterspitzen SafeSeal® low binding, steril (100 µl, 200 µl) | Biozym |
| Immuno-Blot® PVDF-Membran | Bio-Rad |
| Injekt®-F solo, 1 ml | B. Braun |
| Kimtech Science Präzisionstücher | Kimberly-Clark |
| Kleenex Facial Tissues | Kleenex |
| LightCycler® Kapillaren (20 µl) | Roche |
| Mikro-Probengefäß 1,3 ml K3 EDTA | Sarstedt |
| GentleMACS™ M-Tubes | Miltenyi Biotec |
| Objektträger Menzel-Gläser SUPERFROST ULTRA PLUS® | Thermo Fisher Scientific |
| PARAFILM® M | Pechiney Plastic Packaging |
| Pasteurpipetten Glas | Brand |
| Pasteurpipetten Polyethylen | Brand |
| PCR-Tubes, 0,5 ml, bunt | Biozym |
| Petrischalen (100 x 15 mm) | BD |
| Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1250 µl) | Sarstedt |
| Polypropylen-Röhre (15 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| Polypropylen-Sedimentieröhrchen (15 ml, 50 ml) | Greiner Bio-One |

| | |
|--|---------------------|
| Rotilabo-Abdeckfolien für Mikrottestplatten | Roth |
| Rotilabo-Cryobox für Cryoröhrchen | Roth |
| Rundbodenröhrchen, 14 ml | BD |
| Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2 ml) | Eppendorf |
| Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| Seakem® LE Agarose | Biozym |
| Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) | Sarstedt |
| SHIELDskin CHEM® NEO NITRIL® 300 Handschuhe | SHIELD Scientific |
| Steriflip-GP 0,22 µm, 50 ml | Merck Millipore |
| Sterilisationsklebeband | Hartenstein |
| Swingsette™ Biopsie-Einbettkassetten | Roth |
| TC-Flaschen mit Belüftung (75 cm², 175 cm²) | Sarstedt |
| TouchNTuff 300 mm Nitrilhandschuhe | Ansell |
| Trockenblock 37 x 100 mm, 50 Blatt | Labomedic |
| Vakuumfiltrationssystem „rapid“-Filtermax (150 ml, 500 ml) | TPP |
| Wägeschälchen, 80 x 80 mm | Heathrow Scientific |
| Whatman gel blotting paper GB003 | Sigma Aldrich |
| Zellkulturpetrischalen (100 x 20 mm) | BD |
| Zellkulturplatten (6 Well, 12 Well, 24 Well) | BD |
| Zellschaber 13,5 mm, 16 cm | Sarstedt |
| Zentrifugenröhrchen, 15 ml konisch PP | Biochrom |

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

2.1.3 Chemikalien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---------------------|
| 2 % Bis Solution | Bio-Rad |
| 2-Propanol p.A. | Merck Millipore |
| 40 % Acrylamid Lösung | Bio-Rad |
| 4N NaOH | Merck Millipore |
| Aceton p.A. | Merck Millipore |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Bio-Rad |
| Ampicillin | Ratiopharm |
| Antibody Diluent with Background Reducing Components | Dako |

| | |
|---|---|
| 2 % Bisacrylamid | Bio-Rad |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich |
| BSA (fatty acid free) | Roche |
| BSA (Fraktion V) | Biomol |
| BSA (Fraktion V) für ELISA | Sigma-Aldrich |
| Chloroform p.A. | Merck Millipore |
| Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail | Roche |
| Coomassie Brilliant Blue R-250 | Bio-Rad |
| DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) | Sigma-Aldrich |
| Desoxycholat | Sigma-Aldrich |
| Difco™ LB Agar, Miller | BD |
| Difco™ LB Broth, Miller | BD |
| Direct Red 80 (Sirius-Red) | Sigma-Aldrich |
| DMEM F-12 | Lonza |
| DMEM mit stabilem Glutamin, 4,5 g/l Glukose | Biochrom |
| DMSO | Sigma-Aldrich |
| Dulbecco's PBS (1x) | Sigma-Aldrich |
| ECL Prime WB Detection Reagent | GE Healthcare |
| Endo-Porter | GeneTools |
| Entellan® | Merck Millipore |
| Eosin G-Lösung | Roth |
| Essigsäure (99 %) | Merck Millipore |
| Ethanol abs. p.A. | Merck Millipore |
| Ethanol technisch | Chemikalienausgabe Universität Regensburg |
| Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) | Merck Millipore |
| Fettstift Pen | Dako |
| Fluorescence Mounting Medium | Dako |
| Formaldehydlösung 37 % | Merck Millipore |
| Fötales Rinderserum (FBS) | Biochrom & Sigma-Aldrich |
| Gel Loading Dye Purple (6x) | New England BioLabs |
| Glycerin p.A. | Merck Millipore |
| Glycin p.A. | Merck Millipore |
| Hämalaun-Lösung | Roth |
| Humanes Insulin, 100 I.E./ml | Lilly |
| IGEPAL® CA-630 | Sigma-Aldrich |
| Kaliumchlorid | Merck Millipore |

| | |
|---|---|
| Lipofectamine™ 3000 Reagent | Thermo Fisher Scientific |
| Magermilchpulver Reform | Frema |
| Magnesiumchlorid | Merck Millipore |
| Methanol p.A. | Merck Millipore |
| Methanol technisch | Chemikalienausgabe Universität Regensburg |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Merck Millipore |
| NaCl, 0,9 % | B. Braun |
| Natriumazid | Fluka |
| Natriumchlorid p.A. | Merck Millipore |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck Millipore |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck Millipore |
| Natriumhydroxid | Merck Millipore |
| Natriumpyruvat, 100 mM for cell culture | Biochrom |
| Normalserum G6767 | Sigma |
| Nukleasefreies Wasser | Promega |
| Opti-MEM™ mit L-Glutamin | Thermo Fisher Scientific |
| PBS Dulbecco-Pulver | Merck Millipore |
| Penicillin / Streptomycin | PAN-Biotech |
| PeqGOLD Prestained Protein Marker V | Peqlab |
| PeqGOLD Prestained Protein Marker VI | Peqlab |
| PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail | Roche |
| Pikrinsäure 1,2 % | Sigma-Aldrich |
| Protein Block, Serum-free | Dako |
| Quick-Load 1 kb DNA-Ladder | New England BioLabs |
| Quick-Load 100 bp DNA-Ladder | New England BioLabs |
| Roti-GelStain | Roth |
| Roti-Histol | Roth |
| RPMI mit stabilem Glutamin | Biochrom |
| Salzsäure rauchend | Merck Millipore |
| Schwefelsäure rauchend | Merck Millipore |
| SOC Outgrowth Medium | New England BioLabs |
| Stickstoff, flüssig | Linde |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat | Roth |
| Tris-NH₃ | Merck Millipore |
| Tris-HCl | Merck Millipore |
| TRIzol® Reagenz | Thermo Fisher Scientific |

| | |
|-------------------------------------|-----------------|
| Trypsin 0,05 % / EDTA 0,02 % | PAN-Biotech |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich |
| Wasserstoffperoxid 30 % | Merck Millipore |
| Zitronensäure | Merck Millipore |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.

2.1.4 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lösungen und Puffer bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.4.1 Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|---|---|
| 50x TAE-Puffer | 121 g Tris-NH ₃ 28,6 ml Essigsäure 50 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 0,5 l ddH ₂ O |
| 1%iges Agarosegel | 1,5 g Seakem® LE Agarose 150 ml 1x TAE-Puffer 7,5 µl Roti-GelStain |
| 10x Gelladepuffer Lagerung bei 4 °C | 5,8 ml 87 % Glycerin 0,025 g Bromphenolblau 0,025 g Xylencyanol ad 10 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 |

Tabelle 4: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Arbeiten mit DNA.

2.1.4.2 Lösungen und Puffer für das Arbeiten mit Proteinen

2.1.4.2.1 Lösungen und Puffer für die Extraktion von Proteinen

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|---|--|
| RIPA-Lysepuffer für Proteinisolation aus Zellen Lagerung bei 4 °C | 2,5 ml 3 M NaCl 0,5 ml 10 % Igepal 0,25 g Desoxycholat 0,25 ml 20 % SDS-Lösung 2,5 ml 1 M Tris, pH 7,5 ad 50 ml ddH ₂ O Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail kurz vor Verwendung zugegeben |

| | |
|---|---|
| RIPA-Lysepuffer für Proteinisolation aus Gewebestücken mit dem GentleMACS Lagerung bei 4 °C | 2,5 ml 3 M NaCl 0,25 g Desoxycholat 2,5 ml 1 M Tris, pH 7,5 ad 50 ml ddH ₂ O Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail kurz vor Verwendung zugegeben 10 % Igepal (100 µl pro ml RIPA) und 20 % SDS-Lösung (5 µl pro ml RIPA) nach Homogenisierung zugegeben |
|---|---|

Tabelle 5: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Extraktion von Proteinen.

2.1.4.2.2 Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|---|---|
| Lösung für 15 % Laufgele, pH 8,7 Lagerung bei 4 °C | 30 ml 40 % Acrylamid 3,4 ml 2 % Bisacrylamid 10 ml 3 M Tris-HCl, pH 8,7 0,4 ml 20 % SDS-Lösung 32 ml ddH ₂ O 5 µl APS / ml 3 µl TEMED / ml |
| Lösung für 5 % Sammelgele, pH 6,8 Lagerung bei 4 °C | 5 ml 40 % Acrylamid 2,6 ml 2 % Bisacrylamid 5 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 0,2 ml 20 % SDS-Lösung 24 ml ddH ₂ O 10 µl APS / ml 3 µl TEMED / ml |
| 5x Lämmli | 0,3 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 5 ml 20 % Glycerin 2 ml 20 % SDS-Lösung 1 ml β-Mercaptoethanol 0,025 g Bromphenolblau ad 10 ml ddH ₂ O |
| 10x SDS-PAGE-Laufpuffer | 144 g Glycin 30 g Tris-NH ₃ 50 ml 20 % SDS-Lösung ad 1 l ddH ₂ O |

Tabelle 6: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE.

2.1.4.2.3 Lösungen und Puffer für das Western Blotting

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|--|---|
| 10x Tank-Puffer | 140 g Glycin 30 g Tris-NH ₃ 50 ml 20 % SDS-Lösung ad 1 l ddH ₂ O |
| Wettransfer-Puffer Lagerung bei 4 °C | 200 ml MeOH 80 ml 10x Tank-Puffer ad 1 l ddH ₂ O |

Tabelle 7: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für das Western Blotting.

2.1.4.2.4 Lösungen und Puffer für die Antikörperfärbung spezifischer Proteine

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|---|--|
| 10x TBS | 24,2 g Tris-NH ₃ 80 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O pH 7,6 mit HCl einstellen |
| 1x TBS-T | 1 l 1x TBS 1 ml Tween® 20 |
| 5 % Blockierlösung Lagerung bei 4 °C | 100 ml 1x TBS-T 5 g Magermilchpulver |
| Antikörperlösung Sterilfiltration und Lagerung bei 4 °C | 7,5 g BSA 0,5 g Natriumazid 0,5 g Tween® 20 ad 0,5 l 1x TBS |

Tabelle 8: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Antigenspezifische Färbung.

2.1.4.2.5 Lösungen für die Färbung aller Proteine

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------------------|--|
| Entfärber für Coomassie | 50 ml Eisessig 200 ml EtOH 100 % ad 0,5 l ddH ₂ O |

Tabelle 9: Liste der verwendeten Lösungen für die Färbung aller Proteine.

2.1.4.2.6 Lösungen und Puffer für den ELISA

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| ELISA-Waschpuffer | 0,5 ml Tween® 20 ad 1 l 1x PBS |
| Reagent Diluent für ELISA Sterilfiltration und Lagerung bei 4 °C | 5 g BSA ad 0,5 l 1x PBS |
| Stopplösung | 5,7 ml Schwefelsäure (rauchend) ad 50 ml ddH ₂ O |

Tabelle 10: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für den ELISA.

2.1.4.3 Lösungen und Puffer für die Sirius-Red-Färbung

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------------|---|
| 1x PBS-T | 0,25 ml Tween® 20 ad 0,5 l 1x PBS |
| Sirius-Red-Lösung | 500 mg Direct Red 80 (Sirius-Red) 500 ml Pikrinsäure 1,2 % |

Tabelle 11: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Sirius-Red-Färbung.

2.1.4.4 Lösungen und Puffer für die immunhistochemische Färbung

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|--|---|
| Waschpuffer | 0,5 ml Tween® 20 ad 1 l 1x TBS |
| Citratpuffer Herstellung direkt vor Gebrauch | 18 ml Stammlösung A 82 ml Stammlösung B ad 1 l ddH ₂ O |
| Stammlösung A für Citratpuffer Lagerung bei 4 °C | 21,01 g Zitronensäure Monohydrat ad 1 l ddH ₂ O |
| Stammlösung B für Citratpuffer Lagerung bei 4 °C | 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad 1 l ddH ₂ O |

Tabelle 12: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die immunhistochemische Färbung.

2.1.4.5 Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung

| Lösung / Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| Waschpuffer | 500 µl Tween® 20 ad 1 l 1x TBS |
| Blockierlösung | 50 µl Normalserum 10 mg BSA ad 1 ml 1x TBS |
| Antikörperlösung Lagerung bei 4 °C | 10 mg BSA ad 1 ml 1x TBS |

Tabelle 13: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung.

2.1.5 Medien für die Kultivierung von Prokaryoten und Eukaryoten

2.1.5.1 Medien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen

| Zellart | Medium |
|---|--|
| Medium zur Kultivierung von Hepa1-6-, HepG2- Hep3B- und Huh7-Zellen Lagerung bei 4 °C | DMEM ohne Na-Pyruvat, mit stabilem Glutamin, 3,7 g/l NaHCO ₃ und 4,5 g/l D-Glukose + 10 % FBS + 1 % Penicillin / Streptomycin |
| Medium zur Kultivierung von LX-2-Zellen Lagerung bei 4 °C | DMEM ohne Na-Pyruvat, mit stabilem Glutamin, 3,7 g/l NaHCO ₃ und 4,5 g/l D-Glukose + 2 % FBS + 1 % Penicillin / Streptomycin |
| Medium zur Kultivierung von RAW 254.7-Zellen Lagerung bei 4 °C | RPMI ohne Na-Pyruvat, mit stabilem Glutamin und 2,0 g/l NaHCO ₃ + 10 % FBS + 1 % Penicillin / Streptomycin |

Tabelle 14: Liste der verwendeten Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen.

2.1.5.2 Lösungen und Medien für die Kultivierung und Selektion von prokaryotischen Zellen (*E. coli*)

| Lösung / Medium | Zusammensetzung |
|---|--|
| Ampicillin-Stocklösung 100 mg/ml | 1 g Ampicillin-ratiopharm® 10 ml ddH ₂ O |
| LB-Agarplatten mit Ampicillin-Selektion Lagerung bei 4 °C | 25 g Difco™ LB Agar, Miller (Luria-Bertani) ad 1 l ddH ₂ O Autoklavierung 15 min bei 120 °C 1 ml Ampicillin-Stocklösung nach Abkühlung auf 50 - 60 °C zugeben und in Petrischalen gießen |
| LB-Flüssigmedium mit Ampicillin-Selektion | 25 g Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) ad 1 l ddH ₂ O Autoklavierung 15 min bei 120 °C 1 ml Ampicillin-Stocklösung nach Abkühlung auf 50 - 60 °C zugeben |

Tabelle 15: Liste der verwendeten Medien und Lösungen zur Kultivierung und Selektion von prokaryotischen Zellen (*E. coli*).

2.1.6 Enzyme

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|------------------------|---------------------|
| <i>EcoRI</i>-HF | New England Biolabs |
| <i>HindIII</i> | New England Biolabs |
| <i>PvuII</i>-HF | New England Biolabs |
| <i>XbaI</i> | New England Biolabs |
| T4 DNA-Ligase | New England Biolabs |

Tabelle 16: Liste der verwendeten Enzyme.

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

| Antikörper | Bezugsquelle | Wirtsspezies |
|------------------------------|----------------|--------------|
| AKT (pan) | Cell Signaling | rabbit |
| Caveolin-1 | Cell Signaling | rabbit |
| CD163 | Serotec | mouse |
| c-JUN | Santa Cruz | rabbit |
| Desmin | Abcam | rabbit |
| ERK1/2 (p44/p42 MAPK) | Cell Signaling | mouse |

| | | |
|---|----------------------------|--------|
| FAS | Cell Signaling | rabbit |
| GAPDH | Cell Signaling | rabbit |
| HaloTag | Promega | rabbit |
| JNK | Cell Signaling | rabbit |
| PDZK1 | R&D Systems | goat |
| PDZK1 | Thermo Scientific | rabbit |
| phospho-AKT (Ser473) | Cell Signaling | rabbit |
| phospho-ERK1/2 (p44/42 MAPK) (Thr202/Tyr204) | Cell Signaling | rabbit |
| SCD1 | Cell Signaling | rabbit |
| SMAD3 | Abcam | rabbit |
| MnSOD | Frontier Laboratories | rabbit |
| SR-BI | US Biological | goat |
| SR-BI | US Biological | rabbit |
| SREBP1c | Thermo Scientific | mouse |
| SNTA | Marvin Adams (Kooperation) | rabbit |
| SNTB2 | Marvin Adams (Kooperation) | rabbit |
| α-Tubulin | Cell Signaling | mouse |
| TUBA8 | Thermo Scientific | mouse |
| TUBA8 | Thermo Scientific | rabbit |

Tabelle 17: Liste der verwendeten primären Antikörper.

Bei Western Blot Analysen wurden die primären Antikörper in der Regel 1:1000 mit Western Blot-Antikörperlösung verdünnt. Für immunhistochemische bzw. Immunfluoreszenzfärbungen wurde die optimale Verdünnung individuell bestimmt und mit der jeweiligen Antikörperlösung angesetzt.

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

| Antikörper | Bezugsquelle | Wirtsspezies |
|---|-------------------------|--------------|
| Anti-Kaninchen-Antikörper, HRP-konjugiert | Jackson Immuno Research | donkey |
| Anti-Maus-Antikörper, HRP-konjugiert | Jackson Immuno Research | goat |
| Anti-Ziege-Antikörper, HRP-konjugiert | Jackson Immuno Research | donkey |
| Anti-Maus Alexa Fluor®, 488 konjugiert | Invitrogen | goat |
| Anti-Kaninchen Alexa Fluor®, 488 konjugiert | Invitrogen | goat |
| Anti-Maus Alexa Fluor®, 546 konjugiert | Invitrogen | goat |
| Anti-Kaninchen Alexa Fluor®, 546 konjugiert | Invitrogen | goat |

Tabelle 18: Liste der verwendeten sekundären Antikörper.

Bei Western Blot Analysen wurden die sekundären Antikörper in der Regel 1:5000 mit 5 % Blockierlösung verdünnt. Für histologische immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen wurden die sekundären Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 mit der entsprechenden Antikörperlösung verwendet.

2.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Die Primer wurden über die Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen.

2.1.8.1 Primer für die semiquantitative Real-Time PCR Analysen muriner Gene

| Gen | Orientierung | Sequenz 5' nach 3' | Amplikon |
|-----------------|--------------|--------------------------|----------|
| 18S rRNA | uni | GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC | 217 bp |
| | rev | CATCTAAGGGCATCACAGACC | |
| αSMA | uni | CCAGCACCATGAAGATCAAG | 129 bp |
| | rev | CTTCGTCGTATTCTGTTTGC | |
| CD4 | uni | TTCGGCATGACACTCTCAGT | 112 bp |
| | rev | CGTTTTCTCTGCAAAGTTGA | |
| CD8 | uni | CTGTCGTGCCAGTCCTTCA | 183 bp |
| | rev | CCAAGGGTGCCCAGATGTAA | |
| CD68 | uni | TGATCTTGCTAGGACCGCTTA | 357 bp |

| | | | |
|-----------------|-----|-------------------------------|--------|
| | rev | CCCCTTGGACCTTGGACTA | |
| CIDEA | uni | GGAAAAGGGACAGAAATGGAC | 104 bp |
| | rev | TCAGCCTGTATAGGTCGAAGG | |
| CIDEC | uni | GGCTCACAGCTTGGAGGAC | 129 bp |
| | rev | GCCAGGGCTTGAAGTATT | |
| CLEC2H | uni | TGGATATGGACAGACAACACTGA | 130 bp |
| | rev | TGCTACAAATCCACTTCCTATGTG | |
| COL1A1 | uni | CAGGGTCCTCCTGGTTCTC | 124 bp |
| | rev | GACCGTGAGTCCGTCTTTG | |
| CTGF | uni | CAAAGCAGCTGCAAATACCA | 188 bp |
| | rev | GGCCAAATGTGTCTTCCAGT | |
| CYP4A12A | uni | CTTCTCAGGAGGAGCAAGGA | 128 bp |
| | rev | GTATGGGGATTGGGACTCTG | |
| F4/80 | uni | TGCTCTTCCTGATGGTGAGA | 182 bp |
| | rev | CCCCGTCTCTGTATTCAACC | |
| GAPDH | uni | TGTCCGTCGTGGATCTGAC | 375 bp |
| | rev | AGGGAGATGCTCAGTGTTGG | |
| HSD3B5 | uni | ACCTTCGGTCGAAAACAGG | 112 bp |
| | rev | CCTGGCAGGCTCTCTTCA | |
| Ly49C | uni | CCCTATTCCAGGGAGCTGT | 129 bp |
| | rev | TCTGTTTACCAGGAAGGAAGATG | |
| NCR1 | uni | TTGGCTCTTACAACGACTATGC | 138 bp |
| | rev | GTTGAAAGGTCAAACCTCCCAAT | |
| SAA2 | uni | GCAGGATGAAGCTACTCACCA | 143 bp |
| | rev | GCCAGCTTCCTTCATGTCAG | |
| SLC15A5 | uni | CCTGTCAGCGTGCATGATT | 121 bp |
| | rev | AGAGAAAAGTTTGCCTGAAGGA | |
| SNTA | uni | CATCCTGTCTGTGAATGGTGA | 122 bp |
| | rev | AGGGTGAGACCTCCTTCATGT | |
| TGFβ | uni | CTGGGCACCATCCATGAC | 140 bp |
| | rev | CAGTTCTTCTCTGTGGAGCTGA | |
| TNFα | uni | CCGATGGGTTGTACCTTGTC | 352 bp |
| | rev | GGGCTGGGTAGAGAATGGAT | |
| TUBA8 | uni | ACCTGGAGCCTACCGTAGTAGA | 110 bp |
| | rev | GCGGGCGTAATTGTTAGC | |
| YWHAZ | uni | GCAATTACTGAGAGACAACTTGAC A | 96 bp |
| | rev | TGGAAGGCCGGTTAATTTT | |

Tabelle 19: Liste der verwendeten LightCycler® Primer für murine Gene.

2.1.8.2 Primer für die semiquantitative Real-Time PCR Analysen humaner Gene

| Gen | Orientierung | Sequenz 5' nach 3' | Amplikon |
|--------------|--------------|-----------------------|----------|
| MnSOD | uni | AGAAGTACCAGGAGGCGTTG | 91 bp |
| | rev | TTGATATGACCACCACCATTG | |
| SNTA | uni | GAGGTGCTGAAGGCGAGA | 360 bp |
| | rev | CTCTGCAAAAGGCACTGGT | |
| SR-BI | uni | TGGAACCTCTGGGCAAATG | 128 bp |
| | rev | TGGGGATGCCTTCAAACAC | |

Tabelle 20: Liste der verwendeten LightCycler® Primer für humane Gene.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen der humanen und murinen 18S rRNA konnte für humane Proben dasselbe Primerpaar wie für murine Proben verwendet werden (siehe Tabelle 19).

2.1.8.3 Klonierung von murinen Genen in pHTN HaloTag® CMV-neo

2.1.8.3.1 Primer für die PCR

| Gen | Orientierung | Sequenz 5' nach 3' | Amplikon | Restriktions-schnittstelle |
|--------------|--------------|---|----------|----------------------------|
| SNTA | uni | CGACGATCGCAGCGTCAGGC AGGCGCGCT | 1499 bp | <i>PvuI</i> |
| | rev | CGATCTAGACTAGGCCAAGA GCCCCAAGCGGG | | <i>XbaI</i> |
| SNTB2 | uni | CGAGAATTGCGGGTGTGGAC GCGGG | 1560 bp | <i>EcoRI</i> |
| | rev | CGATCTAGATCACACAAGCA GTCCCATGCGAGTGA | | <i>XbaI</i> |
| TUBA8 | uni | CGAGAATTCAGGGAATGCAT ATCGGTCCA | 1347 bp | <i>EcoRI</i> |
| | rev | CGATCTAGATTAAAATTCCTC CCCCTCATTCTC | | <i>XbaI</i> |

Tabelle 21: Liste der verwendeten Primer für die Polymerasekettenreaktion.

2.1.8.3.2 Primer für die Sequenzierung

| Gen | Orientierung | Sequenz 5' nach 3' |
|--------------|--------------|-------------------------------|
| SNTA | uni | CAGATCGGCACATTCATACC |
| | uni | AAGTGTCTACAGCCTGCACG |
| | uni | GCCATCCTGTCTGTGAATGG |
| SNTB2 | uni | CCTCATCTCCAAGATCTTCCC |
| | uni | CTTGATCTTACGCTGCAAGG |
| | uni | TCTGGATGTCGGTCACCCTC |
| TUBA8 | uni | TCTTCCACAGCTTTGGTGGG |
| | uni | GCCCCATCATTTCTGCTGA |
| | uni | CGAGAATTCAGGGAATGCATATCGGTCCA |

Tabelle 22: Liste der verwendeten Primer für die Sequenzierung.

2.1.8.4 siRNAs

| Gen | Orientierung | Sequenz 5' nach 3' | Identifikationsnummer |
|-------------|--------------|-----------------------|-----------------------|
| SNTA | sense | CAAGAUGCCUAUUCUCAUUTT | s74113 |
| | antisense | AAUGAGAAUAGGCAUCUUGTT | |
| | sense | CGAUGGUCUUUAUCAUCCATT | s74114 |
| | antisense | UGGAUGAUAAAGACCAUCGTT | |
| | sense | UGAAGGAGGUCUCACCCUATT | s74115 |
| | antisense | UAGGGUGAGACCUCCUUCATG | |

Tabelle 23: Liste der verwendeten siRNAs.

2.1.9 Kitsysteme

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---------------------|
| Cholesterin CHOD – PAP LIQUICOLOR | Diaglobal |
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Roche |
| DuoSet® ELISA Mouse Adiponectin | R&D Systems |
| DuoSet® ELISA Mouse Chemerin | R&D Systems |
| ECL Plus Western Blotting Detection Reagent | GE Healthcare |
| EnVision + System-HRP (DAB) | Dako |
| Genopure Plasmid Midi Kit | Roche |
| Q5® High-Fidelity 2x Master Mix | New England Biolabs |
| LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I | Roche |

| | |
|---|--------------------------|
| Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric) | Abcam |
| MinElute Gel Extraction Kit | Qiagen |
| MinElute PCR Purification Kit | Qiagen |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific |
| QIAprep Spin MiniPrep Kit | Qiagen |
| Quantichrom™ Glucose Assay Kit | Biotrend |
| Reverse Transcription System | Promega |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| Substrate Reagent Pack | R&D Systems |
| Triglycerid-GPO-PAP | Roche |

Tabelle 24: Liste der verwendeten Kitsysteme.

2.1.10 Organismen

2.1.10.1 Eukaryoten

| Eukaryoten | | Bezugsquelle |
|-------------------|-----------|--|
| Zelllinien | Hepa1-6 | murines Hepatom (ATCC) |
| | HepG2 | humanes hepatozelluläres Karzinom (ATCC) |
| | Hep3B | humanes hepatozelluläres Karzinom (ATCC) |
| | Huh7 | humanes hepatozelluläres Karzinom (ATCC) |
| | LX-2 | immortalisierte primäre humane hepatische Sternzellen (Merck Millipore) |
| | RAW 264.7 | muriner Leukämie Virus induzierter Tumor (ATCC) |
| Säugetiere | C57BL/6J | Inzuchtstamm der Spezies <i>Mus musculus domesticus</i> (Jackson Laboratory) |
| | SNTA -/- | C57BL/6J, SNTA-Knockout (Jackson Laboratory) |
| | SNTB2 -/- | C57BL/6J, SNTB2-Knockout (Marvin Adams, Kooperation) |

Tabelle 25: Liste der verwendeten Eukaryoten.

2.1.10.2 Prokaryoten

| Prokaryoten | Bezugsquelle |
|--|----------------------------|
| NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) | DH5α (New England Biolabs) |

Tabelle 26: Liste der verwendeten Prokaryoten.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit humanen Proben

Alle Studien wurden gemäß der Richtlinien der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung *Human Tissue and Cell Research* durchgeführt und von dem hiesigen Ethikkomitee der Universität Regensburg genehmigt. Zudem lag von jedem Patienten eine Einverständniserklärung vor.

2.2.1.1 Patienten mit nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD)

Während abdominalen Operationen wurde Lebergewebe von Patienten für Forschungszwecke entnommen und RNA daraus gewonnen. Die Gründe für die Operationen waren hepatozelluläre Metastasen eines extrahepatischen Tumors, fokale noduläre Hyperplasie (FNH), Adenome der Leber, Cholangiokarzinome, HCC und andere die Leber betreffende Krankheiten. Gewebe von Patienten mit einer Leberschädigung durch Alkohol Abusus, virale Infektion oder Drogen wurden nicht verwendet. Die Lebern wurden histologisch untersucht und nach einem Scoring-System der *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* bewertet [87]. Dieses beruht auf 14 histologischen Parametern der NASH, von denen vier innerhalb eines Wertebereichs beurteilt werden können: Steatose (0 - 3), Entzündung (0 - 2), hepatozelluläres *Ballooning* (0 – 2) und Fibrose (0 - 4). Nach der Addition aller Werte ergibt sich folgende Definition: 0 - 1 normale Leber, 1 - 4,5 Fettleber und ≥ 5 NASH. Innerhalb der Kohorte ergaben sich demnach bei einer Gesamtzahl von 103 Patienten folgende Gruppen: 32 Kontrollen mit einer gesunden Leber, 36 Patienten mit einer Fettleber und 35 Patienten mit einer NASH. Weitere Charakteristika der Kohorte sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

| | Kontrollen | Fettleber | NASH | p-Werte |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--|
| Männer / Frauen | 15 / 17 | 18 / 18 | 22 / 13 | |
| Alter [Jahre] | 58 (20 – 82) | 60 (24 – 84) | 66 (33 – 82) | 0,008 [#] ; 0,03 ^{&} |
| BMI [kg/m²] | 24,6 (18,3 – 30,5) | 28,5 (22,0 – 46,0) | 28,2 (21,0 – 57,7) | <0,001 ^{*,#} |
| ALT [U/l] | 0 | 3 | 10 | 0,01 [#] |
| AST [U/l] | 7 | 16 | 17 | |
| AP [U/l] | 0 | 3 | 10 | 0,01 [#] |
| Bilirubin [mg/dl] | 20 (8 – 50) ³¹ | 34 (17 – 623) ²⁷ | 34 (10 – 984) ³² | < 0,001 ^{*,#} |
| T2D | 24 (8 – 42) ²⁶ | 32 (11 – 688) ²⁶ | 30 (9 – 389) ³¹ | 0,024 [*] |
| AH | 103 (46 – 203) ²⁸ | 95 (37 – 444) ²⁷ | 86 (45 – 826) ³² | 0,018 [#] |
| HC | 0,58 (0,19 – 1,95) ²⁹ | 0,51 (0,19 – 1,99) ²⁷ | 0,53 (0,20 – 0,53) ³³ | |
| Steatose | 0 (0 – 0) | 2 (1 – 2) | 2,5 (1 – 3) | |
| Entzündung | 0 (0 – 0) | 0 (0 – 2) | 2 (0 – 3) | < 0,001 ^{*,#,&} |
| Fibrose | 0 (0 – 0) | 0 (0 – 2) | 2 (0 – 4) | 0,015 [*] |
| NASH-Score | 0 (0 – 0) | 2 (1 – 4,5) | 6 (5 – 9) | < 0,001 ^{*,#,&} |

Tabelle 27: Charakteristika der NAFLD-Kohorte. Angabe des Medians und dessen Wertebereichs. Falls die Werte nicht von allen Patienten dokumentiert wurden, geben hochgestellte Zahlen die Anzahl der Patienten an von denen diese Parameter bekannt waren. Signifikante Unterschiede zwischen * Kontrollen und Patienten mit Fettleber, # Kontrollen und Patienten mit NASH und & Patienten mit Fettleber und NASH wurden durch unterschiedliche hochgestellte Zeichen dargestellt. BMI, Body-Mass-Index; ALT, Alanin-Aminotransferase; AST, Aspartat-Aminotransferase; AP, Alkalische Phosphatase; T2D, Typ-2-Diabetes; AH, arterieller Hypertonus; HC, Hypercholesterinämie.

2.2.1.2 Patienten mit hepatozellulärem Karzinom

Von Patienten mit HCC wurde Tumorgewebe und angrenzendes gesundes Gewebe zu Studienzwecken entnommen. Die Charakteristika sind in Tabelle 28 aufgeführt. Bei keinem Patienten lag eine Infektion mit Hepatitis B und / oder C Virus vor.

| Charakteristika der HCC Kohorte | |
|---------------------------------|--------------------|
| Anzahl | 21 |
| Geschlecht | männlich |
| Alter [Jahre] | 63 (47 - 84) |
| BMI [kg/m²] | 27,7 (19,7 - 44,6) |
| T2D | 11 |
| Fettleber | 6 |
| NASH | 4 |

Tabelle 28: Charakteristika der HCC-Kohorte. Angabe des Medians und dessen Wertebereichs. BMI, Body-Mass-Index; T2D, Typ-2-Diabetes.

Die primären Lebertumore wurden mittels des TNM Klassifikationssystems nach Bewertung des Primärtumors, des Lymphknotenbefalls und der Metastasenbildung eingeteilt [151]: T1 (Tumorausdehnung ≤ 2) in neun Patienten, T2 (Tumorausdehnung $> 2 \leq 5$) in sechs Patienten, T3 (Tumorausdehnung > 5) in fünf Patienten und undefiniert bei einem Patienten. Die Differenzierung des Tumors wurde durch das Grading (G1 = gut differenziert bis G4 = undifferenziert) angegeben: G1 bei drei Patienten, G2 bei 14 Patienten, und unbekannt bei vier Patienten.

2.2.2 Arbeiten mit Versuchstieren

Alle Tierversuche erfüllten die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes, des „*Guide for the care and use of laboratory animals*“ aus dem Jahre 1999 des Instituts für Labortierforschung (Washington, USA) und wurden gemäß der Tierschutz-Versuchstierordnung der Regierung der Oberpfalz und der Regierung von Unterfranken durchgeführt. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden nur männliche Mäuse verwendet.

2.2.2.1 Tierhaltung

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden im Tierlabor des Universitätsklinikums Regensburg bei einer Temperatur von $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, einer konstanten Luftfeuchtigkeit, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h und mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

2.2.2.2 Syntrophin-Knockout-Mäuse

Es wurden innerhalb dieser Arbeit zwei verschiedene Knockout-Mausstämme verwendet. Zum einen die alpha Syntrophin-Knockout (SNTA -/-) Maus und zum anderen die beta2 Syntrophin-Knockout (SNTB2 -/-) Maus. Die SNTA -/- Mäuse wurden von der Firma *The Jackson Laboratory* mit den entsprechenden C57BL/6J Wildtyp-Kontrollen bezogen. Die Tiere wurden für die Versuche entweder direkt im passenden Alter geliefert oder im Tierlabor des Universitätsklinikums Regensburg gezüchtet. Die SNTB2 -/- Tiere wurden in Kooperation von Prof. Dr. Marvin E. Adams (*Department of Physiology and Biophysics, University of Washington, Seattle*) mit den entsprechenden C57BL/6 Wildtyp-Kontrollen zur Verfügung gestellt und im Tierlabor des Universitätsklinikums Regensburg gezüchtet.

2.2.2.3 Diät-induzierte Fettlebererkrankung im Tiermodell

Zur Untersuchung der Effekte des SNTA- und des SNTB2-Knockouts in der NAFLD wurden mit Hilfe spezieller Diäten verschiedene NAFLD-Stadien induziert. Während der Versuche wurde wöchentlich das Gewicht jeder Maus sowie auch der Futterverzehr kontrolliert und dokumentiert.

2.2.2.3.1 Methionin- und Cholin-defiziente Diät

Die Verfütterung einer Methionin- und Cholin-defizienten (MCD)-Diät (E15653-94, Ssniff®, Soest) ist eine gängige Methode der Induktion einer NASH im Mausmodell. Methionin ist eine essentielle Aminosäure, die dem Körper exogen über Nahrung zugeführt werden muss und ein Substrat für die Synthese des Methylgruppendonors S-Adenosylmethionin (SAM) und des Antioxidans Glutathion (GSH). Somit erhöht die Methionin-Defizienz den oxidativen Stress, die Schädigung der Hepatozyten, was letztendlich zur Entzündung und Fibrose in der Leber führt [152]. Cholin kann in Maßen durch eine *de novo* Synthese endogen produziert werden. Als Substrat ist hierbei aber Methionin notwendig. Durch den Mangel an Cholin und Methionin entsteht ein großes Defizit an Phosphatidylcholin, welches einen wichtigen Bestandteil der Plasmamembran darstellt. Dadurch ist der VLDL-basierte Transport von Triglyzeriden aus Hepatozyten in den Blutkreislauf gestört [153]. Dies führt zu einer Lipidakkumulation, sprich einer Steatose in der Leber. Die dazugehörige Kontrolldiät (E15654-04, Ssniff®, Soest) enthält dieselben Bestandteile und zusätzlich auch Methionin und Cholin.

Die MCD-Diät (Bruttoenergiegehalt von 17,6 MJ/kg) wurde fünf SNTA -/- Mäusen, sechs SNTB2 -/- Mäusen und 15 Wildtyp-Mäusen gefüttert. Mit der entsprechenden Kontrolldiät (Bruttoenergiegehalt von 17,6 MJ/kg) wurden sechs SNTA -/- Mäuse, fünf SNTB2 -/- Mäuse und zwölf Wildtyp-Mäuse gefüttert. Die Diät wurde jeweils Mäusen im Alter von neun Wochen mit einer Dauer von zwei Wochen verabreicht. Am Ende der Diät wurden die Mäuse, wie in 2.2.2.4 beschrieben, präpariert.

2.2.2.3.2 Atherogene Paigendiät

Die atherogene Paigendiät ist eine etablierte Hochfettdiät zur Induktion von Krankheitsbildern des metabolischen Syndroms. Die Diät enthält 0,5 % Cholat und 1,25 % Cholesterin [154], wodurch sich sowohl Cholesterin in der Leber ablagert als auch der oxidative Stress erhöht wird. Dies führt schließlich zu der Ausbildung einer Entzündung und Fibrose in der Leber [155].

16 Wochen alte Tiere wurden für zwölf Wochen mit der Paigendiät (S7803-E012, Ssniff, Soest) und der entsprechenden Kontrolldiät (S7803-E000, Ssniff, Soest) gefüttert. Dazu wurden je sieben Mäuse pro Gruppe und Genotyp (SNTA -/- und Wildtyp) verwendet. Der Bruttoenergiegehalt lag bei der Paigendiät bei 20,7 MJ/kg und bei der Kontrolldiät bei 15,1 MJ/kg.

2.2.2.3.3 Hochfettdiät und intraperitoneale Insulin-Injektion

Um das Krankheitsbild der Adipositas im Tiermodell zu erforschen wurde die Hochfettdiät Ssniff® EF R / M acc. D12451 (II) mod. mit einem Bruttoenergiegehalt von 22,1 MJ/kg eingesetzt. Zur Untersuchung, ob SNTA -/- Mäuse eine veränderte Insulin Response während der NAFLD besitzen, wurden jeweils zwölf Knockout-Tiere und zwölf Wildtyp-Mäuse mit einer Hochfettdiät oder einer Standarddiät (Ssniff® EF acc. D12450B (I) mod. mit einem Bruttoenergiegehalt von 17,8 MJ/kg) im Alter von zwölf Wochen für eine Dauer von 17 Wochen gefüttert. 5 min vor der Präparation wurden bei jeweils sechs Mäusen pro Gruppe 1 mU Insulin pro g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Den restlichen Mäusen wurde als Kontrolle ddH₂O gespritzt. Danach erfolgte wie in 2.2.2.4 beschrieben die Präparation.

2.2.2.4 Präparation

Vor der Präparation wurden die Tiere für 14 bis 16 h nüchtern gesetzt, um etwaige metabolische Effekte besser vergleichen zu können. Getötet wurden die Mäuse mittels Inhalation von CO₂ und einem Genickbruch. Sofort nach der Tötung wurde den Mäusen mit Hilfe einer Insulinspritze mit einer 27G-Kanüle (Außendurchmesser 0,4 mm) Blut durch eine Punktion des Herzens entnommen und in ein Mikro-Probengefäß 1,3 ml K3 EDTA überführt. Das darin enthaltene EDTA sorgte für die Antikoagulation des Blutes. Durch eine Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 min wurde das Blutplasma von den Blutzellen getrennt; ersteres wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Des Weiteren wurde das Abdomen der Maus eröffnet und die Leber und die Milz entnommen. Zusätzlich zu diesen Organen wurden auch verschiedene Fettgewebe präpariert: die beiden intraabdominellen Fettdepots – das epididymale Fett der Gonaden und das perirenale Fett der Nieren – sowie das subkutane Fett unter der Bauchdecke. Neben diesen weißen Fettgeweben wurde auch das braune Fettgewebe zwischen den Schulterblättern der Maus entnommen. Ein Teil der entnommenen Gewebe wurde sofort in Cryoröhrchen überführt, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C bis zur RNA- und Proteinisolation gelagert. Der andere Teil wurde in Biopsie-Einbettkassetten Swingsette™ gelegt und in 3,7 % Formaldehydlösung konserviert. Nach dem Einbetten in Paraffin wurden die Paraffinböcke bei Raumtemperatur für histologische Untersuchungen des Gewebes aufbewahrt.

2.2.3 Arbeiten mit Zellen

2.2.3.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

In dieser Arbeit wurden zum einen primäre humane Zellen, wie auch verschiedenen Zelllinien verwendet.

2.2.3.1.1 Isolation von primären Hepatozyten und primären Sternzellen

Die primären Zellen wurden von Patienten, die sich einer partiellen Hepatektomie aufgrund eines HCCs unterziehen mussten, isoliert und von Hepacult zur Verfügung gestellt. Zuerst wurde der Zellverband aufgelöst, die primären Hepatozyten pelletiert und im Überstand die nicht-parenchymalen Zellen gesammelt [156]. Der Überstand wurde in Medium resuspendiert, die Zellen in eine TC-Flasche mit Belüftung (75 cm²) gegeben und bei 37 °C im Brutschrank Heraeus BBD6220 kultiviert. Nach 90 min wurde das Medium

gewechselt und an den folgenden vier Tagen wurde der Mediumswechsel einmal täglich wiederholt. Nach zwei Wochen Kultivierung konnten die primären humanen Sternzellen für Versuche verwendet werden. Die Isolation und die Lyse der primären Sternzellen sowie die Lyse der primären Hepatozyten wurden von Frau Yvonne Hader durchgeführt.

2.2.3.1.2 Kultivierung von hepatischen Zelllinien

Für die *in vitro* Versuche wurden die Zelllinien Hepa1-6, HepG2, Hep3B, Huh7, LX-2 und RAW 264.7 verwendet. Diese wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Humidität im Brutschrank Heraeus BBD6220 in TC-Flaschen mit Belüftung (75 cm²) im entsprechenden Medium kultiviert (siehe 2.1.5.1). Bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium aus der Flasche abgenommen und 3 ml Trypsin 0,05 % / EDTA 0,02 % für 5 min bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit 7 ml Medium vom Flaschenboden abgelöst und in ein Schraubröhrchen überführt. Bei einer Zentrifugation mit 1200 rpm für 5 min wurden die Zellen sedimentiert, der Überstand abgenommen und je nach der Größe des Pellets frisches Medium zugegeben. Je nach Verwendung wurden die Zellen bei einer Verdünnung von 1:5 bis 1:10 wieder in TC-Flaschen mit Belüftung (75 cm²) kultiviert, oder nach der Bestimmung der genauen Zellzahl für Transfektionsversuche in Wells oder Petrischalen ausgesät (siehe 2.2.3.1.3). Zur Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum wurden 1 bis 2 Millionen Zellen im jeweiligen Medium mit 5 % DMSO aufgenommen, in 2 ml Cryoröhrchen aliquotiert und mit Hilfe von Isopropanol im Mr. Frosty Freezing Container langsam auf -80 °C gekühlt. Zum Auftauen der Zellen wurde nach und nach 37 °C warmes Medium in das 2 ml Cryoröhrchen gegeben und alles in ein Schraubröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde der Überstand entfernt und die Zellen in frischem Medium in eine TC-Flaschen mit Belüftung (75 cm²) gegeben. Das in dieser Arbeit verwendete PLC Hepatoma Zelllinien Proteinlysate wurde von der Arbeitsgruppe Weiß des Uniklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt.

2.2.3.1.3 Aussäen von Zellen für Transfektionsversuche

Für Transfektionsversuche wurde eine definierte Anzahl an Zellen in die gewünschten Wells oder Petrischalen ausgesät. Die Zellen sollten für die Versuche, also 24 h nach der Aussaat, eine Konfluenz von ca. 70 bis 80 % aufweisen. Da sich die Proliferationsrate von verschiedenen Zelltypen unterscheidet musste eine unterschiedliche Anzahl von Zellen ausgesät werden (siehe Tabelle 29). Dazu wurden die Zellen mit Trypsin 0,05 % / EDTA

0,02 % abtrypsiniert (siehe 2.2.3.1.2) , auf die Countess™ Cell Counting chamber slides gegeben und mit dem Countess II Automated Cell Counter ausgezählt.

| Zellart | Well einer 6 Well-Platte (9,5 cm ²) | Well einer 12 Well-Platte (3,8 cm ²) | Petrischale (58,1 cm ²) |
|------------------|--|---|--|
| Hepa1-6 | 600.000 | 300.000 | 3,5 – 4 x 10 ⁶ |
| HepG2 | 1 x 10 ⁶ | 400.000 – 500.000 | 6 x 10 ⁶ |
| Hep3B | 400.000 | 150.000 | 2,5 x 10 ⁶ |
| Huh7 | 500.000 | 200.000 | 3 x 10 ⁶ |
| LX-2 | 1 x 10 ⁶ | 400.000 | 6 x 10 ⁶ |
| RAW 264.7 | 300.000 | 75.000 | 2 x 10 ⁶ |

Tabelle 29: Zellzahl eukaryotischer Zellen je nach Zellart und Kulturgefäß.

2.2.3.1.4 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz ist ein Mechanismus, der eingesetzt wird, um Gene noch vor der Translation auszuschalten und dadurch einen spezifischen Knockdown eines Gens zu erreichen [157]. Die dabei verwendeten spezifischen siRNAs (*short interfering RNA*) sind doppelsträngige 21 bis 23 bp lange RNAs, die von der Zelle als Fremd-RNA identifiziert werden können. Der Riboprotein-Komplex RISC (*RNA induced silencing complex*) integriert die siRNA und baut einen der beiden Stränge ab. Mit dem anderen Strang kann er nun spezifisch an die mRNA des Zielgens binden und diese zerschneiden. Die Expression wird somit noch vor der Translation unterdrückt. Eingbracht wurden die siRNAs mit Hilfe des Transfektionsreagenz Endo-Porter. Dabei wird die siRNA über einen Endozytose-vermittelten Prozess in das Zytosol der Zelle eingebracht. Der Transfektionsansatz für ein Well einer 6 Well-Platte war, wie in Tabelle 30 angegeben, zusammengesetzt:

| Komponenten | Volumina |
|------------------------------------|----------|
| siRNA (100 nM) | 10 µl |
| Endo-Porter | 6 µl |
| DMEM F-12 Medium, serumfrei | 84 µl |

Tabelle 30: Endo-Porter Transfektionsansatz für die RNA-Interferenz (für ein Well einer 6 Well-Platte).

Der Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und auf die am Vortag ausgesäten Hepa1-6 Zellen (siehe 2.2.3.1.3) nach Zugabe von frischem DMEM mit

stabilem Glutamin, 4,5 g/l Glukose mit 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C wurden die Zellen zur RNA- oder Proteinisolation wie in 2.2.4.3.1 oder 2.2.5.1.1 beschrieben abgenommen und die Lactat Dehydrogenase im Medium als Maß für die Zytotoxizität gemessen (siehe 2.2.3.1.6).

2.2.3.1.5 Transiente Überexpression von Proteinen

Zur transienten Überexpression von Proteinen in den Zelllinien wurden Plasmide durch das Prinzip der Lipofektion in die Zellen eingebracht. Dabei werden Liposomen mit Nukleinsäuren beladen und über Endozytose mit der Plasmamembran in das Innere der Zelle eingeschleust. Verwendet wurde dazu das Reagenz Lipofectamine™ 3000 Reagent, welches, wie in Tabelle 31 beschrieben, vorbereitet wurde.

| Ablauf | Volumina |
|--|--|
| 1. OptiMEM und Lipofectamine™ 3000 mischen → Opti-Lipo-Mix | 125 µl OptiMEM + 5,6 µl Lipofectamine™ 3000 → Σ 130,6 µl Opti-Lipo-Mix |
| 2. Plasmid in OptiMEM verdünnen und P3000-Reagenz dazugeben → Plasmid-P3000-Mix | 125 µl OptiMEM + 2,5 µg Plasmid-DNA + 5 µl P3000 → Σ 130 µl + x µl Plasmid-P3000-Mix |
| 3. Opti-Lipo-Mix und Plasmid-P3000-Mix mischen (1:1) → Transfektions-Mix | 125 µl Opti-Lipo-Mix + 125 µl Plasmid-P3000-Mix → Σ 250 µl Transfektions-Mix |

Tabelle 31: Lipofectamine™ 3000 Reagent Transfektionsansatz (für ein Well einer 6 Well-Platte).

Die am Vortag ausgesäten Hepa1-6 Zellen wurden mit frischem Medium (DMEM mit stabilem Glutamin, 4,5 g/l Glukose mit 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin) versetzt und bis zur Transfektion wieder bei 37 °C inkubiert. Der Transfektions-Mix wurde bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert und danach auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen lysiert und die Proteine isoliert (siehe 2.2.5.1.1). Als Hinweis auf eine verminderte Viabilität der Zellen wurde die Lactat-Dehydrogenase im Medium bestimmt (siehe 2.2.3.1.6).

2.2.3.1.6 Bestimmung der Zytotoxizität

Die Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, welches an der Milchsäuregärung beteiligt ist und sich im Zytoplasma jeder Zelle befindet. Da es bei einer Zellschädigung sofort zur Freisetzung kommt, kann es in der Zellkultur durch die Messung im Zellüberstand als Marker für die Zytotoxizität verwendet werden [158]. Dabei katalysiert LDH die Oxidation des im Reagenzgemisch enthaltenen Substrats Lactat zu Pyruvat, wobei gleichzeitig das Coenzym NAD^+ zu NADH reduziert wird. Bei allen Transfektionsversuchen wurde nach Beendigung der Inkubationszeit das Medium von den Zellen abgenommen und der LDH-Assay mittels des Cytotoxicity Detection Kits durchgeführt. Dabei wurde der Überstand 1:10 mit dem jeweiligen Medium ohne Serum verdünnt und 100 μl in Duplikaten in die Wells einer 96 Well-Platte pipettiert. Als Blank wurden ebenfalls in Duplikaten 100 μl des jeweiligen Mediums ohne Serum verwendet. Daraufhin wurden auf die Proben 100 μl Reaktionsgemisch gegeben, die Platte mit einer Rotilabo-Abdeckfolie abgedeckt und bei Raumtemperatur für 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 490 nm mittels des iMark™ Microplate Absorbance Readers gemessen, welche direkt proportional zur LDH-Konzentration und somit zur Zytotoxizität ist.

2.2.3.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

2.2.3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde für die Vermehrung von Plasmiden verwendet. Dazu wurden die Bakterien entweder in LB-Flüssigmedium oder LB-Agarplatten mit einer Ampicillin-Selektion (100 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 °C im Brutschrank ORBITAL INCUBATOR S150 kultiviert.

2.2.3.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Vermehrung eines Plasmids wurde die DNA in chemisch kompetente NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) durch Hitzeschock transformiert [159]. Dazu wurden die auf -80 °C gelagerten kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 5 bis zu 10 μl des Ligationsansatzes, oder 1 pg bis 100 ng des Plasmids auf die Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 s bei 42 °C. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Zellen in 900 μl SOC Outgrowth Medium gegeben und für 1 h bei 37 °C im Thermomixer comfort bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt.

Diese Zellsuspension wurde 1:10 und 1:100 verdünnt und 100 µl davon auf LB-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikumselektion ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Einzelkolonien für die weiteren Versuche verwendet.

2.2.3.2.3 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Die Plasmide wurden mittels Plasmid-Präparation aus den *E. coli* Zellen isoliert. Dazu wurden wenige Zellen einer Einzelkolonie von den LB-Agarplatten (siehe 2.2.3.2.2) mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 4 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikumselektion über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden aus der Bakteriensuspension mit Hilfe des QIAprep Spin MiniPrep Kits die Plasmide isoliert. Diese Methode basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Membran und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Pro 4 ml Zellsuspension wurden zwischen 1,5 bis 3 µg Plasmid-DNA eluiert. Um zu untersuchen, ob die Klonierung erfolgreich war und das Zielgen in das Plasmid insertiert wurde, wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 2.2.4.2.4) und über Gelelektrophorese aufgetrennt. Zusätzlich wurden Plasmide mit Insertion bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Regensburg) sequenziert. Die Plasmide mit dem korrekten Insert wurden im großen Maßstab mit Hilfe des Genopure Plasmid Midi Kits aus *E. coli* präpariert. Nach Durchführung des Protokolls nach Herstellerangaben wurde eine Plasmid-DNA Ausbeute von 150 bis 200 µg erzielt.

2.2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.4.1 Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit von DNA und RNA wurden mit Hilfe des NanoDrop 2000 Spectrophotometers gemessen. Dabei wurde aus der Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD 260), dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, die Konzentration mittels folgender Formel bestimmt:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD } 260 \times 40 \text{ bzw. } 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Dabei entspricht eine OD 260 von 1 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde zusätzlich die Optische Dichte bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ (OD 280), dem Absorptionsmaximum von Proteinen gemessen. Der Quotient

aus OD 260 / OD 280 gibt die Reinheit der Nukleinsäurenlösung an. Es wurden nur Proben mit einer Reinheit zwischen 1,8 und 2,0 verwendet.

2.2.4.2 Arbeiten mit DNA

DNA wurde generell bei 4 °C aufbewahrt. Alle Versuche wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf Raumtemperatur ausgeführt.

2.2.4.2.1 Polymerasekettenreaktion

Für die Klonierung von Genen in einen Vektor wurde als Ausgangsbasis das gewünschte Gen in großen Mengen benötigt. Um dies zu erreichen wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation des Zielgens durchgeführt [160]. Als Template wurde murine Leber cDNA verwendet, welche wie in Absatz 2.2.4.3.2 beschrieben, hergestellt wurde. Jedoch wurden für die reverse Transkription neben den random hexamer-Primern auch oligo-(dT)-Primer verwendet. Diese bestehen aus 16 bis 20 Thymidinen, die an den Poly-A-Schwanz von mRNAs binden. Dadurch wurde sichergestellt, dass auch bei größeren Genen die komplette Sequenz revers transkribiert wurde. Für die PCR wurde der Q5® High-Fidelity 2x Master Mix verwendet, da die Q5-Polymerase aufgrund ihrer hohen Prozessivität und ihrer geringen Fehlerrate sehr gut für Klonierungen und lange Amplikons geeignet ist. Im Master Mix waren bereits ein dNTP-Mix, MgCl₂, die Q5-Polymerase und der optimale Puffer enthalten. Der restliche Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen (siehe Tabelle 32):

| Komponenten | Menge |
|--|--------------|
| Template | 150 – 200 ng |
| Primer uni, 10 µM | 1,25 µl |
| Primer rev, 10 µM | 1,25 µl |
| Q5® High-Fidelity 2x Master Mix | 12,5 µl |
| ddH₂O | ad 25 µl |

Tabelle 32: Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion mit der Q5-Polymerase.

Die Amplifikation wurde im PCR-Cycler T1 Thermocycler und einem geeigneten Programm durchgeführt (siehe Tabelle 33). Die optimale Annealing Temperatur wurde mit Hilfe des NEB Tm Calculator individuell für jedes Primerpaar berechnet.

| Phase | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|-------------------------------|---|--------------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 98 °C | 30 s | |
| Denaturierung | 98 °C | 10 s | x 35 Zyklen |
| Annealing | Schmelztemperatur der verwendeten Primer | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 20 - 30 s/kb | |
| Schlusselongation | 72 °C | 2 min | |
| Lagerung | 4 °C | ∞ | |

Tabelle 33: Cyclerprogramm für die Polymerasekettenreaktion mit der Q5-Polymerase.

2.2.4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese wurden negativ geladene DNA-Fragmente durch ein elektrisches Feld in einem 1%igen Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde 1,5 g Seakem® LE Agarose und 150 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle ca. 5 min erhitzt, bis eine klare Flüssigkeit entsteht. Nach kurzem Abkühlen wurde 7,5 µl des Farbstoffes Roti-GelStain zugegeben. Durch die Interkalation des Farbstoffes in die doppelsträngige DNA verstärkt sich dessen Emission, sodass die DNA im UV-Licht sichtbar wird. Das noch flüssige Agarosegel wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm zur Taschenbildung eingesetzt. Nach ca. 20 min wurde das ausgehärtete Gel in eine Wide Mini-Sub Cell GT System Agarosegelelektrophorese-Kammer, gefüllt mit 1x TAE-Puffer, gelegt und der Kamm entfernt. Als nächstes wurden 10 bis 20 µl der DNA, versetzt mit 6x Gel Loading Dye Purple, in die Taschen geladen. Um die Größe des Amplikons bewerten zu können, wurden zusätzlich 10 µl des Quick-Load 100 bp DNA-Ladders oder des Quick-Load 1 kb DNA-Ladders in eine separate Tasche gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 40 min. Zur Bilddokumentation des Bandenmusters wurde das Chemidoc™ XRS+-System verwendet.

2.2.4.2.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Für die Gelextraktion von gewünschten DNA-Fragmenten wurde das MinElute Gel Extraction Kit verwendet. Dazu wurden die in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennten, unter UV-Licht sichtbaren DNA-Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben und ergab pro Bande zwischen 0,5 und 2 µg DNA.

2.2.4.2.4 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Das Schneiden von DNA an expliziten Stellen durch Endonukleasen wurde als Instrument für Klonierungszwecke und zur Überprüfung von Plasmiden nach der Klonierung verwendet. Ursprünglich stammen Restriktionsenzyme aus Bakterien, in denen sie fremde Phagen-DNA erkennen, sie zerschneiden und sich dadurch vor einem Bakteriophagenbefall schützen. Restriktionsenzyme erkennen je nach Spezifikation vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang und schneiden spezifisch an dieser Stelle. Insgesamt sind bis jetzt über 300 verschiedene Restriktionsenzyme bekannt, welche verschiedene DNA Sequenzen schneiden. Mit Hilfe der für die Amplifikation der zu klonierenden DNA verwendeten Primer wurden N- und C- terminal des Zielgens Restriktionsschnittstellen, welche sich auch in der MCS (*multiple cloning site*) des Vektors befinden, angefügt. Der entsprechende Verdau wurde, wie in Tabelle 34 angegeben sowohl mit dem Gen-Fragment als auch mit dem Vektor durchgeführt.

| Komponenten | Menge |
|---------------------------------|----------------------|
| Template (dsDNA, Vektor) | 1 µg |
| 10x Restriktionspuffer | 1 µl |
| Restriktionsenzym(e) | je 1 Unit pro µg DNA |
| ddH₂O | ad 10 µl |

Tabelle 34: Ansatz für den Restriktionsverdau.

Der Verdau mit Restriktionsenzymen geschah bei 37 °C für 1 h. Je nach Angaben des Herstellers wurden die Enzyme im Anschluss daran hitzeinaktiviert.

Zur analytischen Überprüfung des Plasmids nach der Klonierung konnten mit Hilfe eines Testverdaus und der anschließenden Auftrennung der Gen-Fragmente mit einer Agarosegelelektrophorese anhand des Bandenmusters geeignete Plasmide identifiziert werden. Religierte Plasmide ohne Insertion zeigen nach der Inkubation mit Restriktionsenzymen andere Gen-Fragmente als Plasmide mit dem Zielgen als Insert.

2.2.4.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau

Wenn PCR-Produkte oder DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau für den weiteren Versuchsverlauf verwendet werden sollen, wurden mit Hilfe des MinElute PCR Purification Kits die DNA-Fragmente aufgereinigt und alle für den weiteren Versuch

störenden Reagenzien entfernt. Die Aufreinigung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Im Anschluss an den Verdau und der Aufreinigung des Inserts und des Vektors wurden diese beiden DNAs an den komplementären Schnittstellen mit der T4-DNA-Ligase ligiert. Diese stammt aus dem Enterobakterienphagen-T4 und dient dem Bakteriophagen zur DNA-Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur. Unter ATP-Verbrauch katalysiert sie die Entstehung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von DNA-Enden. Die einzusetzende Konzentration von Insert und Vektor wurde mit Hilfe des NEBio Calculator berechnet. Dabei spielte die Länge der DNA-Fragmente und das Verhältnis von Vektor zu Insert eine Rolle. Dieses sollte mindestens 1:5 betragen. Die restlichen Komponenten mit ihren eingesetzten Volumina wurde in Tabelle 35 angegeben.

| Komponenten | Menge |
|--------------------------|----------------------|
| Vektor | 50 – 100 ng |
| Insert | berechnete Menge DNA |
| 10x Ligase-Puffer | 2 µl |
| T4-DNA-Ligase | 1 µl |
| ddH₂O | ad 21 µl |

Tabelle 35: Ansatz für die Ligation.

Innerhalb von 20 min bei Raumtemperatur wurde das DNA-Fragment mit dem Vektor ligiert und anschließend die T4-DNA-Ligase für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

2.2.4.2.7 Sequenzierung bei GeneArt

Um die DNA-Sequenzen nach der konventionellen PCR, der Real-Time PCR oder nach der Klonierung in einen Vektor zu überprüfen, wurden diese Proben bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Regensburg) sequenziert. Dazu wurden 20 ng pro 100 bp der zu sequenzierenden DNA, 10 µM des Sequenzierprimers und ddH₂O ad 8 µl in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und an GeneArt geschickt. Das Sequenzalignment wurde mit Hilfe des *Pairwise Sequence Alignment* (EMBOSS Needle) durchgeführt. Um die

Spezifität der Real Time-PCR Reaktionen zu überprüfen wurde das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) verwendet.

2.2.4.3 Arbeiten mit RNA

Für das Arbeiten mit RNA wurde streng darauf geachtet RNase freie Reaktionsgefäße, Filterspitzen und einen ausschließlich dafür verwendeten Satz Pipetten zu benutzen. Zusätzlich wurde, wenn nicht anders beschrieben, immer auf Eis gearbeitet und die Zentrifugationen bei 4 °C durchgeführt.

2.2.4.3.1 Isolation von RNA mit TRIzol®

Für die Isolation von RNA aus Zellen und Geweben wurde die Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi angewandt [161]. Das dabei verwendete Reagenz TRIzol® enthält Guanidiniumthiocyanat und Phenol. Das Guanidiniumthiocyanat lysiert die Zellen und inaktiviert RNasen. In der Phenolphase lösen sich die Proteine und weitere Makromoleküle; die RNA befindet sich in der wässrigen Phase. Da TRIzol® eine akute orale und dermale Toxizität aufweist wurde die komplette Isolation unter dem Abzug und mit entsprechender Schutzkleidung durchgeführt.

2.2.4.3.1.1 Isolation von RNA aus Zellen mit TRIzol®

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde zuerst der Überstand aus den Wells in ein Reaktionsgefäß gegeben und zur Depletion von eventuell vorhandenem Zellschrott für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für spätere Versuche, wie den LDH-Assay, bei 4 °C aufbewahrt (siehe 2.2.3.1.6). Die Zellen wurden je nach Größe des Wells mit 500 µl bis 1 ml TRIzol® mit Hilfe des Zellschabers abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch eine Insulinspritze mit einer 27G-Kanüle (Außendurchmesser 0,4 mm) fünfmal aufgenommen. Dadurch wurde die Probe vollständig homogenisiert und die DNA geschert. Daraufhin wurden 200 µl Chloroform pro Milliliter TRIzol® zugegeben, das Gefäß invertiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und, um die Phasen zu trennen, für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. In der unteren Chloroformphase befanden sich die Proteine, in der Interphase die DNA und die obere wässrige Phase enthielt die RNA, welche in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Als nächstes wurde erneut 100 µl Chloroform pro Milliliter TRIzol® zugegeben und die darauf folgenden Schritte bis zur Abnahme der RNA

enthaltenden Phase wiederholt. Danach wurde die RNA mit 70%igem EtOH präzipitiert. Dazu wurde 400 µl 70%iger EtOH pro Milliliter TRIzol® auf die wässrige Phase gegeben, resuspendiert und die Lösung sofort auf ein RNeasy Mini Spin Säulchen geladen. Die präzipitierte RNA bindet an die Membran des Säulchens und wurde nach Herstellerangaben des RNeasy Mini Kits von Qiagen aufgereinigt und eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3.1.2 Isolation von RNA aus Geweben mit TRIzol®

Für die Isolation von RNA aus Mausgeweben wurde das nach der Präparation (siehe 2.2.2.4) auf -80 °C gelagerte Gewebe (ca. 200 - 300 mg) mit 500 µl TRIzol® in ein gentleMACS™ M-Tube gegeben und noch bevor es aufgetaut war mit dem gentleMACS™ Dissociator mit dem Programm RNA_02.01 homogenisiert. Nachdem dieses Homogenisat in ein Reaktionsgefäß überführt wurde, konnte das Protokoll der RNA-Isolation aus Zellen angewandt werden (siehe 2.2.4.3.1).

2.2.4.3.2 Reverse Transkription

Reverse Transkriptasen sind virale Enzyme, die RNA in ihre komplementäre cDNA umschreiben können. Die cDNA wird für die Polymerasekettenreaktion benötigt, da DNA eine größere Stabilität als RNA aufweist und die dabei verwendete Taq-Polymerase nur DNA amplifizieren kann. Für die cDNA-Synthese wurde das Reverse Transcription System von Promega verwendet. Die darin enthaltene AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transkriptase synthetisiert einzelsträngige cDNA wobei RNA als Template dient. Als Primer wurden random hexamer-Primer verwendet, welche am RNA-Strang binden und die Reverse Transkription initiieren. Des Weiteren enthält das Kit alle weiteren Komponenten: MgCl₂, Reverse Transkriptions-Puffer, dNTP-Mix und RNasin®, einen Ribonuklease-Inhibitor. Diese wurden, wie in Tabelle 36 beschrieben, eingesetzt.

| Komponenten | Volumina |
|--|----------|
| 25 mM MgCl₂ | 8 µl |
| 10x Reverse Transkriptions-Puffer | 4 µl |
| 10 mM dNTP-Mix | 4 µl |
| random hexamer-Primer 500 µg/ml | 0,5 µl |
| RNasin® Ribonuklease-Inhibitor | 1 µl |
| AMV-Reverse Transkriptase | 1 µl |
| 1 µg RNA in RNase-freiem H₂O | 21,5 µl |

Tabelle 36: Ansatz für die Reverse Transkription.

Die Primerhybridisierung und Elongation der Reversen Transkription erfolgte bei 42 °C für 1 h. Die Inaktivierung der AMV-Reversen Transkriptase bei 95 °C für 5 min. Bis zur Verwendung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3.3 Semiquantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Bei der semiquantitativen Real-Time PCR handelt es sich um eine Analysemethode zur Messung der mRNA-Konzentration definierter Gene. Dabei wird, wie bei einer herkömmlichen PCR die eingesetzte cDNA amplifiziert und zusätzlich die Menge an vervielfältigter cDNA gemessen [162]. Dadurch können Rückschlüsse auf die Wirkung von zum Beispiel Stimulanzien auf die Genexpression gezogen wurden. Für die Quantifizierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green eingesetzt, welcher die Eigenschaft besitzt in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Dadurch steigt die Fluoreszenz proportional mit der Menge des PCR-Produkts an [163]. Die Messung findet am Ende der exponentiellen Phase der Amplifikation bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur statt. Dabei gibt der Cp-Wert (*Crossing point*) an ab welchem Zyklus das zu messende Signal aus dem Hintergrundsignal hervortritt. Zur Überprüfung der Messung des gewünschten Gens wird nach Ablauf der Amplifikation eine Schmelzkurve erzeugt, indem die Temperatur bis auf 95 °C erhöht wird und dadurch die entstandene doppelsträngige cDNA aufgeschmolzen wird. Aufgrund verschiedener GC-Gehälter und Längen der Gene würden unterschiedliche Produkte unterschiedliche Schmelzkurven erzeugen. Dadurch ist es möglich verschiedene Produkte zu differenzieren [164].

Für die semiquantitative Real-Time PCR wurde das LightCycler® 1.5 Instrument mit dem LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit und 20 µl LightCycler® Kapillaren

verwendet. Im LightCycler®-Mix befinden sich die HotStart Taq DNA-Polymerase, ein dNTP-Mix, der geeignete Reaktionspuffer und der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen (siehe Tabelle 37):

| Komponenten | Volumina |
|-------------------------------|----------|
| LightCycler®-Mix | 2 µl |
| 25 mM MgCl₂ | 2,4 µl |
| Primer uni (5 pmol/µl) | 1 µl |
| Primer rev (5 pmol/µl) | 1 µl |
| cDNA (25 ng/µl) | 2 µl |
| ddH₂O | 11,6 µl |

Tabelle 37: Ansatz für die Real-Time Polymerasekettenreaktion.

Die Fluoreszenzmessung findet bei jedem Gen zu den optimalen Bedingungen statt und wird durch vorhergeschaltete Primertests ermittelt. In Tabelle 38 ist der Programmablauf dargestellt.

| Ablauf | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|---------------------------|---------------|--------------|-------------------|
| Hitzeaktivierung | 95 °C | 10 min | |
| Denaturierung | 95 °C | 15 s | x 40-45 Zyklen |
| Annealing | 60 °C | 10 s | |
| Elongation | 72 °C | 10 s | |
| Fluoreszenzmessung | Variabel | 1 s | |
| Schmelzkurve | 60 °C → 95 °C | 0,1 °C pro s | |
| Kühlung | 40 °C | 30 s | |

Tabelle 38: Cyclerprogramm für die semiquantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion.

Um aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal auch eine Konzentration berechnen zu können und die unterschiedlichen Effizienzen verschiedener PCR Reaktionen zu berücksichtigen, wurde zeitgleich eine Standardkurve gemessen. Als Negativkontrolle diente eine PCR Reaktion ohne Template. Zur Normalisierung der mRNA-Konzentrationen wurden, wenn nicht anders angegeben die Referenzgene (Housekeeping Gene) GAPDH, 18S rRNA oder YWHAZ, welche ein konstantes Expressionsniveau aufweisen, eingesetzt.

2.2.4.3.4 Primertest für die semiquantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Für diese Arbeit wurden elf Primerpaare (CD4, CD8, CIDEA, CIDEA, CLEC2H, COL1A1, CYP4A12A, HSD3B5, SAA2, SLC15A5 und TUBA8) für die semiquantitative Genexpressionsanalyse neu etabliert. Die Etablierung besteht aus vier Schritten: 1) Design, 2) Test in der Real-Time PCR, 3) Agarosegelelektrophorese, 4) Sequenzierung. Die Primer wurden teilweise manuell, teilweise mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* von Roche designt. Dabei wurden die Primer nach folgenden Kriterien ausgewählt: Primerlänge ca. 20 Basenpaare, Amplikon von 100 bis 300 Basenpaaren, GC-Gehalt zwischen 45 und 60 %, Schmelztemperatur von ca. 60 °C, Intron-umspannend. Danach wurden die Primer in der Real-Time PCR (siehe 2.2.4.3.3), unter Verwendung von cDNA aus verschiedenen Geweben und Zelltypen, getestet. Dabei wurde bei der Bildung der Schmelzkurve vor allem darauf geachtet, dass nur ein Produkt gebildet wurde. Im nächsten Schritt wurden die DNAs aus der Test Real-Time PCR mittels einer Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.4.2.2) der Größe nach aufgetrennt und einzelne Produkte, welche die korrekte Bandenhöhe des erwarteten Amplikons aufwiesen, ausgeschnitten. Nach der Gel-Aufreinigung mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits (siehe 2.2.4.2.3) wurde das Gen-Fragment bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Regensburg) sequenziert (siehe 2.2.4.2.7) und das Ergebnis mit der Sequenzdatenbank mittels des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) verglichen. Nach korrektem Ablauf dieser Tests konnten die neuen Primerpaare für die semiquantitative Real-Time PCR eingesetzt werden.

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1 Proteinextraktion

In dieser Arbeit wurden Proteine sowohl aus Zelllysaten, als auch aus Geweben mittels RIPA-Lysepuffer isoliert. Dabei werden Membran-, Zellkern- und Zytoplasma-Proteine zusammen extrahiert. Die Isolation des Gesamtproteins aus den Zellen oder dem Gewebe wurde, wenn nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt; alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4 °C statt.

2.2.5.1.1 Proteinextraktion aus Zellen

Zuerst wurde der Überstand der Zellen aus den Wells in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, um etwaigen Zellschrott zu entfernen. Der davon

geklärte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und für spätere Assays, wie der LDH-Messung, bei 4 °C aufbewahrt (siehe 2.2.3.1.6). Daraufhin wurde auf die Zellen in den Wells 0,5 bis 1 ml 1x PBS-Puffer mit Complete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail gegeben, in dem sie mit Zellschabern abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 4000 rpm und 1 min bei 8000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet – je nach Größe – in 50 bis 100 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation des Zelllysats bei Raumtemperatur wurden die Proben mit Hilfe des Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 2070 bei 20 % Amplitude für 10 s geschallt. Dabei wurde genomische DNA geschert und DNA-Protein- oder Protein-Protein-Interaktionen aufgelöst. Im letzten Schritt wurde das Lysat erneut für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, um nicht lysierte Bestandteile zu pelletieren und im Überstand das reine Proteinlysate zu erhalten. Dieses wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert.

2.2.5.1.2 Proteinextraktion aus Gewebe

Direkt nach der Entnahme der Gewebe aus der Maus wurde dieses für die Proteinextraktion in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Verarbeitung auf -80 °C aufbewahrt (siehe 2.2.2.4). Dieses Gewebestück (ca. 200 bis 300 mg) wurde zusammen mit 1,5 ml RIPA-Lysepuffer in ein gentleMACS™ M-Tube gegeben und noch bevor es auftaute mit dem gentleMACS™ Dissociator mit dem Programm Protein_01.01 homogenisiert. Danach wurde dieses Homogenisat in ein Reaktionsgefäß gegeben, in dem bereits 150 µl 10 % IGEPAL und 7,5 µl 20 % SDS-Lösung vorgelegt waren. Nach dem dreimaligen Schallen der Proben mit Hilfe des Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 2070 bei 25 % Amplitude für 10 s wurde das Lysat für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Dabei wurde darauf geachtet die bei manchen Geweben vorhandene Fettschicht, welche sich nach der Zentrifugation auf dem Überstand bildet, nicht mit abzunehmen. Bei Bedarf wurde die Zentrifugation und das Abnehmen des reinen Lysats wiederholt. Bis zur Verwendung wurde das Proteinlysate bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5.2 BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der kolorimetrische Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet, welcher nach der Methode von Smith *et al.* funktioniert.

Dabei reduzieren Proteine unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen (Biuret-Reaktion), welche mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Farbstoff komplexieren [165]. Diese Farbintensität ist direkt proportional zur Proteinkonzentration der Lösung welche mit Hilfe einer Standardkurve berechnet werden kann. Damit sich die Proteinkonzentration der Proben innerhalb des Standard-Messbereichs (2000 $\mu\text{g/ml}$ bis 31,25 $\mu\text{g/ml}$) befindet, wurden Zelllysate 1:10 und Leberlysate 1:50 mit 1x PBS verdünnt. Für die Messung wurden je 10 μl der verdünnten Probe in Triplikaten und der Standard in Duplikaten in eine 96 Well-Platte pipettiert und 200 μl des Reagenzgemischs (Reagenz A:Reagenz B, 50:1) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C im Brutschrank ORBITAL INCUBATOR S150 wurde die Extinktion bei 540 nm mit dem iMark™ Microplate Absorbance Reader gemessen und die Konzentrationen mittels des Standards im Programm MPM6 von Bio-Rad berechnet.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli angewandt [166]. Dabei wird die Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergens SDS überlagert und die Proteinstruktur entfaltet [167]. Dazu kommt eine Spaltung der Disulfidbrücken mit Hilfe von β -Mercaptoethanol durch Reduktion und das Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen durch fünfminütiges Aufkochen. Durch diese vollständige Denaturierung und die einheitlich negative Ladung können die Proteine in einer Elektrophoresekammer ausschließlich aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Dafür wurde ein 15%iges Trenngel mit einem engen Netz aus Polyacrylamid und darüber einem 5%igem Sammelgel mit weiten Poren und zusätzlichen Taschen für die Beladung der Proben zwischen zwei Glasplatten gegossen. Den entsprechenden Gellösungen wurde APS als Radikalstarter und TEMED als Katalysator der Polymerisation zugesetzt. Es wurden jeweils 20 μg Gesamtprotein pro Tasche geladen, welche zuvor mit 5x Lämmli Puffer versetzt wurden. Die Proben und 5 μl des PeqGOLD Prestained Protein Markers wurden in die Taschen des Sammelgels geladen und eine Stromstärke von 25 mA pro Gel für ca. 70 min angelegt. Dabei wurden die Proteine zuerst im Sammelgel aufkonzentriert und danach im Laufgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

2.2.5.4 Western Blotting

Im nächsten Schritt wurden die Proteine, die in der SDS-PAGE im Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, mittels des Wettransfer Western Blot Verfahrens auf eine Immuno-Blot® PVDF-Membran übertragen [168]. Dazu wurde die kurz in Methanol aktivierte Membran und das Gel, zwischen mit Wettransfer-Puffer äquilibrierte Whatman gel blotting paper GB003 in das mit Wettransfer-Puffer befüllte Mini Trans Blot Module, eingespannt. Bei Blotbedingungen von 80 V für 90 min wurden die negativ geladenen Proteine von der Anode angezogen und auf die Membran übertragen.

2.2.5.5 Antikörperfärbung spezifischer Proteine

Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion angewandt. Dabei bindet der antigenspezifische Primärantikörper an das passende Epitop des zu detektierenden Proteins auf der Membran. An den Primärantikörper bindet dann wiederum ein weiterer sekundärer Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierter Antikörper. Die Oxidation des HRP-Substrats Luminol führt dann zur messbaren Chemilumineszenz Emission welche dem nachgewiesenen Protein entspricht. Für die Umsetzung der Antikörper-spezifischen-Färbung wurden alle Inkubations- und Waschschrte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler Rotamax 120 durchgeführt. Zuerst wurde die Membran nach dem Western Blot Verfahren für 1 h mit 5 % Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verringern. Danach wurde die Membran nach vier 1x TBS-T Waschschrten für je 15 min mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach drei zehnminütigen 1x TBS-T Waschschrten für 1 h mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach weiteren drei zehnminütigen Waschschrten mit 1x TBS-T und zwei fünfminütigen Waschschrten mit 1x TBS konnte das Chemilumineszenzsignal mit Hilfe des ECL Prime WB Detection Reagent und dem Imaging System ChemiDoc™ XRS+ detektiert werden. Vermessen wurden die Banden mit Hilfe des Bearbeitungsprogramms ImageJ. Zur Normalisierung wurde, wenn nicht anders angegeben, entweder die Antikörperfärbung von GAPDH, einem Housekeeper Protein mit konstantem Expressionsniveau, oder die Coomassie-Färbung der Membran verwendet.

2.2.5.6 Coomassie-Färbung unspezifischer Proteine

Zur Färbung aller Proteine wurde der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 verwendet, der sich an die basischen Seitenketten von Aminosäuren anlagert und

sie dadurch unabhängig von deren Sequenz anfärbt. Diese Färbung dient als Ladekontrolle der Proteinmenge und wird nach der spezifischen Antikörperfärbung durchgeführt. Dazu wurde die Membran für ca. 20 min in die Coomassie-Färbelösung gegeben und danach mit Entfärber und / oder mit H₂O entfärbt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nachdem ein colorimetrisches Bild mit dem Imaging System ChemiDoc™ XRS+ gemacht wurde, konnte die Beladung densitometrisch mit dem Bearbeitungsprogramm ImageJ überprüft werden.

2.2.5.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Quantifizierung von Proteinen in Lösung, wie zum Beispiel im Serum oder Proteinlysaten, wurde ein DuoSet® ELISA angewandt, welcher nach der Sandwich-Technik funktioniert. Dabei werden zwei Antikörper verwendet, die an zwei verschiedene Epitope des zu messenden Proteins binden. Der erste Antikörper, auch *capture antibody* genannt, wird an einer 96 Well-Platte verankert und bindet dort das gewünschte Protein. Der zweite Antikörper, auch *detection antibody* genannt, bindet dann an einem anderen Epitop ebenfalls das Zielprotein, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Dieser kann dann durch die Kopplung des *detection antibodies* an Biotin detektiert werden. Dabei wird Streptavidin-HRP an Biotin gebunden und das farblose Reaktionsgemisch vom Substrate Reagent Pack zugegeben, welches durch HRP quantitativ in ein farbiges Produkt umgesetzt wird.

Für die Durchführung wurden zuerst 100 µl *capture antibody* in entsprechender Verdünnung mit 1x PBS über Nacht in einer 96 Well-Platte gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden die Wells mit 200 µl Reagent Diluent für 1 h blockiert und erneut dreimal gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit 100 µl Probe in Duplikaten für 2 h, wobei das gewünschte Protein an den *capture antibody* bindet. Zur quantitativen Analyse wurde zusätzlich zu den Proben ein Standard mit definierten Konzentrationen des zu messenden Proteins ebenfalls in Duplikaten aufgetragen. Danach wurden die nicht gebundenen Proteine mit drei Waschschritten entfernt und die Wells mit 100 µl *detection antibody* in entsprechender Verdünnung mit Reagent Diluent für 2 h inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten erfolgte die Bindung von Streptavidin-HRP an das Biotin des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes durch eine Inkubation von 100 µl Reagenz für 20 min im Dunkeln. Weitere vier Waschschrritte folgten bevor 100 µl der Reagenzien des Substrate Reagent Packs zugegeben wurden. Daraufhin wurden die Proben im Dunkeln für 20 min, währenddessen der Farbumschlag erfolgte, inkubiert.

Nachdem die Enzymreaktion mit Stopplösung beendet wurde, konnte die Absorption bei 450 nm mit Hintergrundkorrektur bei 540 nm mit dem iMark™ Microplate Absorbance Reader gemessen und die Konzentrationen mittels des Standards im Programm MPM6 von Bio-Rad berechnet werden.

2.2.6 Messung von Triglyzeriden in Seren und Leberlysaten

Die Messung der Triglyzeride in Seren und Leberproben wurde mit Hilfe des Triglycerid-GPO-PAP Kits durchgeführt. Der dabei ablaufende enzymatische Prozess (siehe Abbildung 4) endet in einer messbaren zur Triglyzeridkonzentration direkt proportionalen kolorimetrischen Emission bei 540 nm, welche mit dem iMark™ Microplate Absorbance Reader gemessen werden konnte.

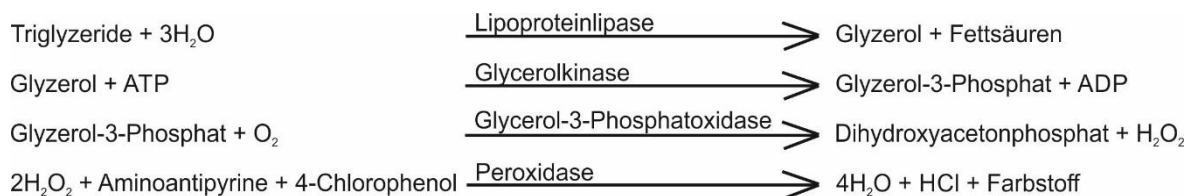


Abbildung 4: Enzymatischer Prozess der Triglyzeridmessung.

2.2.7 Messung von Cholesterin in Seren und Leberlysaten

Zur Bestimmung der Cholesterinkonzentration in Seren und Leberlysaten wurde das Cholesterin CHOD – PAP LIQUICOLOR Kit verwendet. Bei der Reaktion werden Cholesterinester durch die im Reaktionsgemisch enthaltenen Cholesterinesterasen in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Daraufhin kommt es mit Hilfe von Sauerstoff und Cholesterinoxidase (CHOD) zu der Oxidation von Cholesterin zu Cholestenon. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, welches mit 4-Aminophenazon (PAP) und Phenol einen roten Farbstoff bilden kann. Die Absorption wurde mit Hilfe des iMark™ Microplate Absorbance Reader bei 540 nm gemessen und entsprach direkt proportional der Cholesterinkonzentration.

2.2.8 Messung des oxidativen Stresses in der Leber

Eine Folge von oxidativem Stress ist die oxidative Degradation von Lipiden. Daher wurde für die Messung des oxidativen Stresses der Lipid Peroxidation Assay Kit (Colorimetric / Fluorometric) in Leberlysaten angewandt. Dabei wird Malondialdehyd

(MDA), welches ein Endprodukt der Lipidperoxidation und somit des oxidativen Stresses ist, gemessen. Durch die Reaktion des freien MDAs mit Thiobarbitursäure (TBA) entsteht ein MDA - TBA Addukt, das kolorimetrisch bei 540 nm detektiert werden kann. Die Lyse der Leberproben und die Durchführung des Assays geschahen nach Angaben des Herstellers. Die Messung mit Hilfe des iMark™ Microplate Absorbance Readers.

2.2.9 Histologische Untersuchung

Um die histologischen Eigenschaften von Geweben zu untersuchen, wurden diese zur Erhaltung der Strukturen nach der Präparation (siehe 2.2.2.4) in 3,7 % Formaldehydlösung für mindestens 24 h fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Daraufhin wurden die Gewebe mit Hilfe des Microtoms RM 2145 in 3 µm dünnen Schnitten auf einen Objektträger von Menzel-Gläser SUPERFROST ULTRA PLUS® gebracht. Mit diesen Paraffinschnitten konnten die Hämalaun-Eosin-Färbungen, die Sirius-Red-Färbungen, immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt werden.

2.2.9.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung wurde verwendet, um die histologischen Strukturen eines Gewebes darzustellen. Dabei dient Hämalaun als blauer Farbstoff, der alle basophilen Strukturen, wie den Zellkern mit der darin enthaltenen DNA, anfärbt. Eosin dagegen färbt alle acidophilen Strukturen, die sich vor allem im Zytoplasma befinden, rot an. Zur Durchführung der Färbung wurden die vorbereiteten Paraffinschnitte (siehe 2.2.9) zuerst mit Histol entparaffiniert und danach durch eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert (siehe Tabelle 39).

| Absteigende Alkoholreihe | | | | |
|--------------------------|------------|-----------|-----------|--------------------|
| 2x 10 min | 2x 5 min | 2x 5 min | 2x 5 min | 5 min |
| Histol | 100 % EtOH | 96 % EtOH | 70 % EtOH | ddH ₂ O |

Tabelle 39: Absteigende Alkoholreihe für die Entparaffinierung und Rehydratisierung.

Nach der Rehydratisierung des Gewebes wurden die Objektträger für 5 min in Hämalaun inkubiert und danach unter fließendem Leitungswasser die gewünschte Blaufärbung erzeugt. Gleich im Anschluss wurden die Objektträger für die Rotfärbung des

Zytoplasmas für 5 min in Eosin G-Lösung inkubiert und mit der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe Tabelle 40).

| Aufsteigende Alkoholreihe | | | | |
|---------------------------|-----------|-----------|------------|----------|
| 1x 2 min | 2x 2 min | 2x 2 min | 2x 2 min | 2x 5 min |
| ddH ₂ O | 70 % EtOH | 96 % EtOH | 100 % EtOH | Histol |

Tabelle 40: Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung.

Die gefärbten Gewebe wurden mit Deckgläschen Menzel-Gläser 24 x 50 mm und Entellan® eingedeckt und mit dem Mikroskop Eclipse E600 mikroskopiert.

2.2.9.2 Sirius-Red-Färbung

Mit Hilfe der Sirius-Red-Färbung wurden mögliche fibrotische Veränderungen in der Leber dargestellt. Sirius-Red ist ein hydrophiler, saurer Farbstoff, der Bindegewebe rot anfärbt, indem er sich längs von Kollagenfasern anlagert. Für die Färbung werden Paraffinschnitte zuerst entparaffiniert und rehydratisiert (siehe Tabelle 39). Danach werden sie für 10 s in 1x PBS-T gegeben und danach für 30 min in Sirius-Red-Lösung angefärbt. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 40) wurde die Färbung mit Deckgläschen Menzel-Gläser 24 x 50 mm und Entellan® eingedeckt und mit dem Mikroskop Eclipse E600 mikroskopiert.

2.2.9.3 Immunhistochemische Färbung

Für immunhistochemische Färbungen wurde das EnVision+ System-HRP von Dako verwendet. Dabei entsteht durch die Oxidation von Diaminobenzidin (DAB) durch HRP ein braunes Präzipitat, welches im normalen Licht detektiert werden kann. Dazu wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydratisiert (siehe Tabelle 39). Danach wurden sie zur Antigendemaskierung in Citratpuffer für 20 min aufgekocht und darin auch wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Daraufhin wurden die Schnitte mit dem Fettstift Pen umrandet, um die zur Färbung verwendeten Reagenzien und Lösungen auf diesen Bereich zu konzentrieren. Nach zwei fünfminütigen Waschschritten mit Waschpuffer folgte eine zehnminütige Inkubation mit Peroxidase Blocker, wodurch unspezifische Hintergrundfärbungen verringert wurden. Zusätzlich dazu wurde nach zwei fünfminütigen Waschschritten ein Protein Blocking Reagenz auf die Schnitte getropft und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dies lediglich entfernt und der gewünschte

primäre Antikörper in individueller Verdünnung mit Antibody Diluent bei 4 °C über Nacht gebunden. Um eine spezifische Färbung zu überprüfen, wurden als Negativkontrollen zusätzlich Isotypkontrollen und Kontrollen ohne primären Antikörper angefertigt. Der folgende Tag begann mit zwei fünfminütigen Waschschritten gefolgt von einer dreißigminütigen Inkubation mit dem passenden sekundären Polymer-HRP markierten Antikörper. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und das DAB-Chromogen auf die Schnitte getropft. Die Inkubationszeit hängt dabei vom Antikörper und dessen Verdünnung ab. Sobald eine intensive bräunliche Färbung zu sehen war, wurde die Reaktion mit ddH₂O abgestoppt und die Schnitte mit der aufsteigenden Alkoholreihe wieder entwässert (siehe Tabelle 40). Zum Schluss wurden die gefärbten Gewebe mit Deckgläschen Menzel-Gläser 24 x 50 mm und Entellan® eingedeckt und mit dem Mikroskop Eclipse E600 mikroskopiert.

2.2.9.4 Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Entparaffinierung und Rehydtratisierung der Gewebeschnitte mit der absteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 39) wurden die Schnitte mit Citratpuffer für 20 min aufgekocht, darin wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einem Fettstift Pen umrandet. Weiter wurden die Schnitte dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und mit Blockierlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Blockierlösung abgekippt und einer oder mehrere primäre Antikörper über Nacht bei 4 °C auf die Schnitte gegeben, welche in bestimmter Konzentration in Antikörperlösung verdünnt wurden. Als Negativkontrolle wurden sowohl Isotypkontrollen, als auch Proben ohne primäre Antikörper verwendet. Nach weiteren drei zehnminütigen Waschschritten folgte ein Blockierschritt für 1 h. Daraufhin wurde diese wieder entfernt und sofort mit den sekundären Antikörpern für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden nach drei zehnminütigen Waschschritten mit einer DAPI Gegenfärbung die Zellkerne blau gefärbt. Dabei wurde die DAPI-Lösung 1:1000 mit 100 % EtOH verdünnt und für 5 min im Dunkeln auf den Schnitten inkubiert. Als letzten Waschschriff wurden die Objektträger für 5 min in ddH₂O gegeben und danach mit Deckgläschen Menzel-Gläser 24 x 50 mm und Fluorescence Mounting Medium eingedeckt. Mikroskopiert wurden die Färbungen mit dem Olympus Mikroskop BX61.

2.2.10 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung von gepaarten Proben wurde der Student's t-test im Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmonk, USA) verwendet. Für nicht gepaarte Proben wurde der Mann-Whitney-U-Test im Statistik- und Analyse-Software SPSS 21.0 bzw. 23.0 Programm (IBM, Leibniz Rechenzentrum, München) berechnet. Dieses Programm wurde zusätzlich auch für Spearman Korrelationen, die Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Bonferroni und den entsprechenden Diagrammen angewandt. Dabei fassen Boxplots in einer fünf-Punkte-Darstellung alle wichtigen Werte zusammen. Dazu gehört der Median, die obere und die untere Quartile und die beiden Extremwerte. Zusätzlich werden Ausreißer als Sterne oder Kreise dargestellt. Eine Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 SNTA in der humanen Leber

Das zytoplasmatisch lokalisierte und membranassoziierte Adapterprotein SNTA ist Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes und bisher hauptsächlich im Muskel erforscht [112, 114, 149]. SNTA ist aber auch in der Leber exprimiert und spielt des Weiteren eine Rolle im Glukose- und Lipidmetabolismus [107, 108, 135, 136, 169]. Daher wurde die Expression von SNTA in Lebern von Patienten mit NAFLD untersucht. Das Spektrum der NAFLD umfasst die Fettleber, die sich über die NASH, welche mit Entzündung und Fibrose einhergeht, zu Zirrhose und HCC differenzieren kann [26]. Da für SNTA eine differentielle Expression in verschiedenen Tumorgeweben gezeigt wurde [103], sollte auch analysiert werden, ob dessen Proteinmenge im HCC verändert ist.

Die hepatische SNTA-mRNA-Expression wurde in 32 Kontrollen, 36 Patienten mit einer Fettleber und 35 Patienten mit einer NASH bestimmt. Von 21 Patienten des HCC-Kollektivs wurde Nicht-Tumorgewebe und Tumorgewebe analysiert. Die genauere Beschreibung der Kollektive erfolgte in Abschnitt 2.2.1.1.

3.1.1 SNTA-Expression in der NAFLD

3.1.1.1 Hepatische SNTA-mRNA-Expression in Korrelation zu verschiedenen Parametern

SNTA zeigte weder innerhalb der Kontrollgruppe, noch innerhalb der gesamten Kohorte eine differenzielle mRNA-Expression zwischen Frauen ($n = 55$) und Männern ($n = 48$) (siehe Abbildung 5 A). Ein Vergleich der SNTA-mRNA-Expression gemäß der Body-Mass-Index (BMI) Klassifikation ergab ebenfalls keine Unterschiede (siehe Abbildung 5 B). Dabei wurden 37 Patienten mit einem $\text{BMI} \leq 25 \text{ kg/m}^2$ als normalgewichtig, 35 Patienten mit einem $\text{BMI} > 25 < 30 \text{ kg/m}^2$ als übergewichtig und 31 Patienten mit einem $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ als adipös angesehen. Auch die Operationsindikationen (Metastasen extrahepatischer Tumore ($n = 59$), Cholangiokarzinom ($n = 14$), HCC ($n = 11$), fokale noduläre Hyperplasie ($n = 8$), Adenom ($n = 5$) und andere Erkrankungen ($n = 6$)) zeigten keine Assoziationen mit der SNTA-mRNA-Expression (siehe Abbildung 5 C).

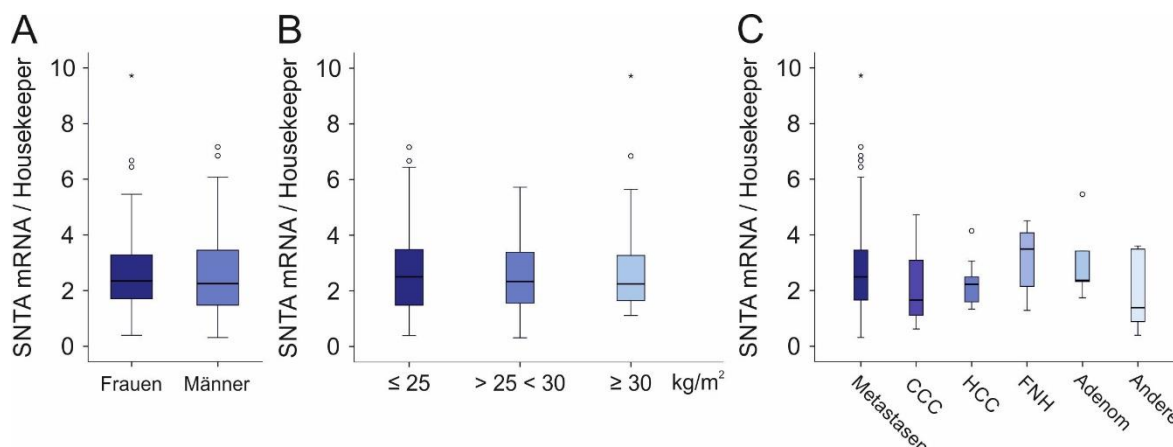


Abbildung 5: Hepatische SNTA-mRNA-Expression der NAFLD-Kohorte in Bezug auf verschiedene Parameter. A SNTA-mRNA-Expression bei Frauen und Männern. B SNTA-mRNA-Expression in Patienten mit einem Body-Mass-Index von ≤ 25 kg/m² (Normalgewicht), $> 25 < 30$ kg/m² (Übergewicht) und ≥ 30 kg/m² (Adipositas). C SNTA-mRNA-Expression bei verschiedenen Operationsindikationen: Metastasen, Metastasen extrahepatischer Tumore; CCC, Cholangiokarzinom; HCC, Hepatozelluläres Karzinom; FNH, fokale noduläre Hyperplasie.

3.1.1.2 Hepatische SNTA-mRNA-Expression in Korrelation zu Charakteristika der NASH

Mit Hilfe des NASH-Scores wurden alle Probanden der NAFLD-Kohorte in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt (siehe 2.2.1.1). Die Kontrollen (n = 32) mit einem NASH-Score von 0, die Patienten mit einer Fettleber (n = 36) mit einem NASH-Score von < 5 und die Patienten mit einer NASH (n = 35) definiert über einen NASH-Score ≥ 5 . Im Vergleich der SNTA-mRNA-Expression der Kontrollen mit 2,5 (0,3 - 7,2) und der NASH-Patienten mit 1,9 (0,4 - 6,1) zeigte sich eine tendenzielle Erniedrigung (p = 0,052). Beim Vergleich der SNTA-mRNA-Expression zwischen den Fettleber-Patienten (3,0 (0,8 - 9,7)) und den NASH-Patienten konnte eine Signifikanz von p = 0,019 festgestellt werden (siehe Abbildung 6 A). Des Weiteren wurden mögliche Assoziationen zwischen dem SNTA-mRNA-Expressionslevel und Charakteristika der NASH sowie des NASH-Scores berechnet. Dabei wurde eine negative Korrelation zum Steatosegrad (r = -0,225; p = 0,022), zum Entzündungsgrad (r = -0,382; p < 0,001), zum Fibrosegrad (r = -0,231; p = 0,032) und zum NASH-Score (r = -0,247; p = 0,012) ermittelt (siehe Abbildung 6 B - D und Daten nicht gezeigt).

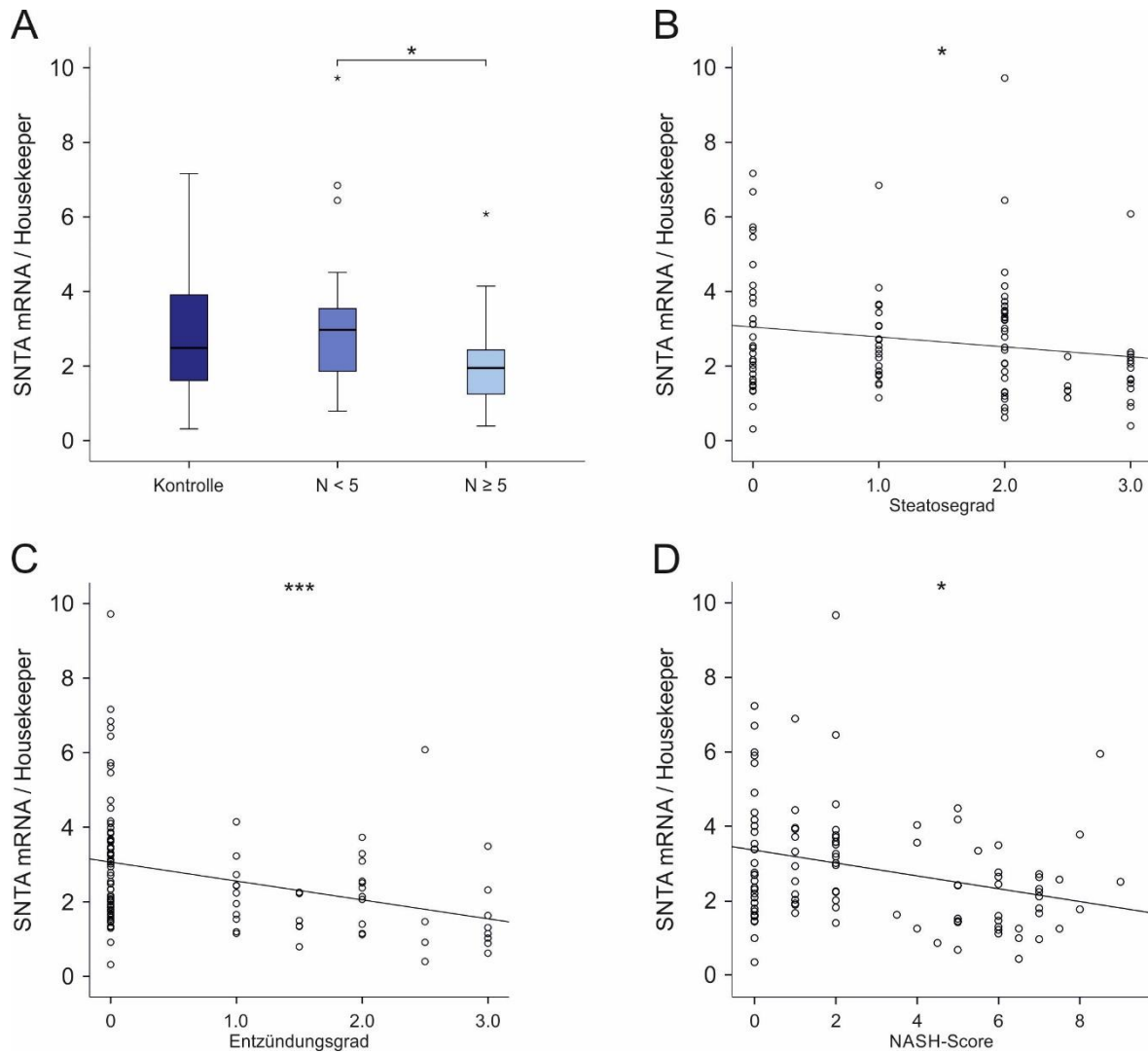


Abbildung 6: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte in Bezug auf Parameter der NASH. A SNTA-mRNA-Expression in den Kontrollen (NASH-Score (N) = 0) und den NAFLD-Patienten mit einem NASH-Score < 5 und ≥ 5. B Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit dem Steatosegrad. C Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit dem Entzündungsgrad. D Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit dem NASH-Score. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3.1.1.3 Hepatische SNTA-mRNA-Expression bei Komorbiditäten der NAFLD

NAFLD geht meist mit Komorbiditäten wie Hypertension, Hypercholesterinämie und Typ-2-Diabetes einher. In der untersuchten NAFLD-Kohorte leiden 40 Patienten an Bluthochdruck, 13 Patienten an Hypercholesterinämie und 13 Patienten an Typ-2-Diabetes. Die SNTA-mRNA-Expression war im Vergleich zu Probanden, die diese Erkrankungen nicht aufwiesen, unverändert (siehe Abbildung 7 A, B und Daten nicht gezeigt). Der NASH-Score dagegen war sowohl bei den Patienten mit Hypertension ($p = 0,055$) als auch den Patienten mit Hypercholesterinämie ($p < 0,001$) und den

Patienten mit Typ-2-Diabetes ($p = 0,001$) tendenziell oder sogar hoch signifikant erhöht [170].

Innerhalb der Subgruppe der NASH-Patienten zeigte sich eine Erhöhung der SNTA-mRNA-Expression bei Patienten mit Typ-2-Diabetes ($n = 10$) im Vergleich zu den Probanden ohne Typ-2-Diabetes ($n = 25$) (siehe Abbildung 7 C). Bei den NASH-Patienten mit Hypercholesterinämie ($n = 10$) oder Hypertension ($n = 17$) konnte dagegen keine erhöhte SNTA-mRNA-Expression verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

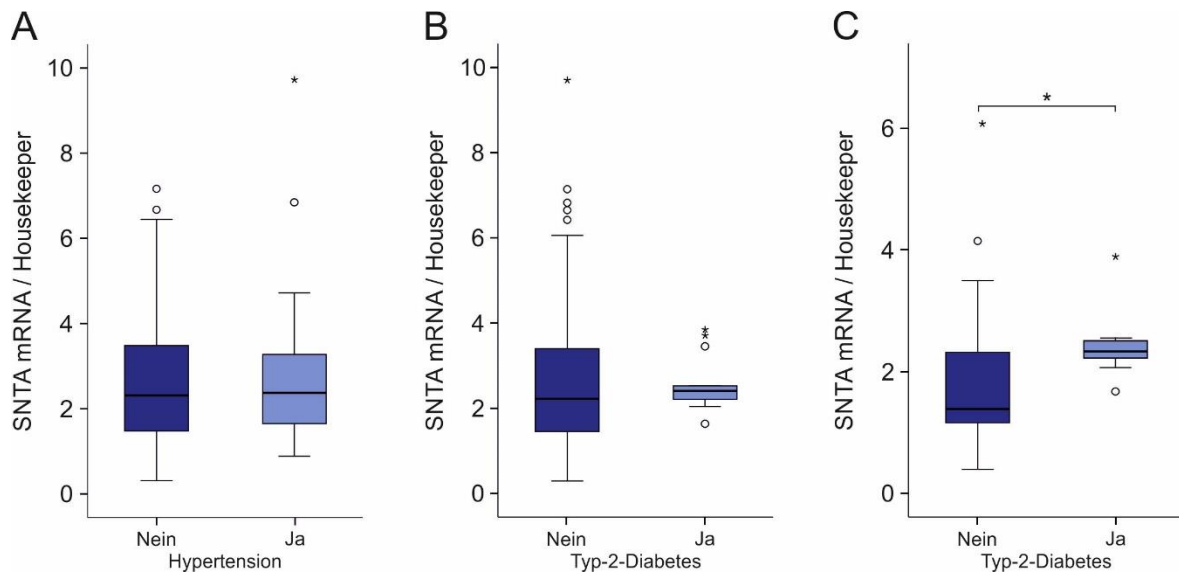


Abbildung 7: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte bei Hypertension- und Typ-2-Diabetes-Patienten. A SNTA-mRNA-Expression bei Probanden ohne und mit Hypertension. B SNTA-mRNA-Expression bei Probanden ohne und mit Typ-2-Diabetes. C SNTA-mRNA-Expression bei NASH-Patienten ohne und mit Typ-2-Diabetes. * $p < 0,05$.

Innerhalb der Subgruppe der NASH-Patienten war der NASH-Score und der Steatosegrad zwischen den Patienten mit ($n = 10$) und ohne ($n = 25$) Typ-2-Diabetes ähnlich (siehe Abbildung 8 A). Der Fibrosegrad dagegen war bei NASH-Patienten mit Typ-2-Diabetes signifikant erhöht ($p = 0,034$) und der Entzündungsgrad signifikant erniedrigt ($p = 0,007$) (siehe Abbildung 8 B, C).

Bei Ausschluss der Typ-2-Diabetes-Patienten aus der Kohorte war die SNTA-mRNA-Expression im Vergleich der drei verschiedenen Gruppen des Kollektivs im Verhältnis zueinander ähnlich, wie unter Einbeziehung aller Probanden. Die SNTA-mRNA-Expressionslevel lagen bei den 32 Kontrollen bei 2,5 (0,3 – 7,2), bei den 33 Fettleber-Patienten bei 2,9 (0,8 – 9,7) und bei den 25 NASH-Patienten bei 1,4 (0,4 – 6,1). Die NASH-Patienten zeigten damit eine tendenziell erniedrigte Expression im Vergleich zu

den Kontrollen ($p = 0,05$) und eine signifikant niedrigere Expression im Vergleich zu den Fettleber-Patienten ($p = 0,025$) (Daten nicht gezeigt).

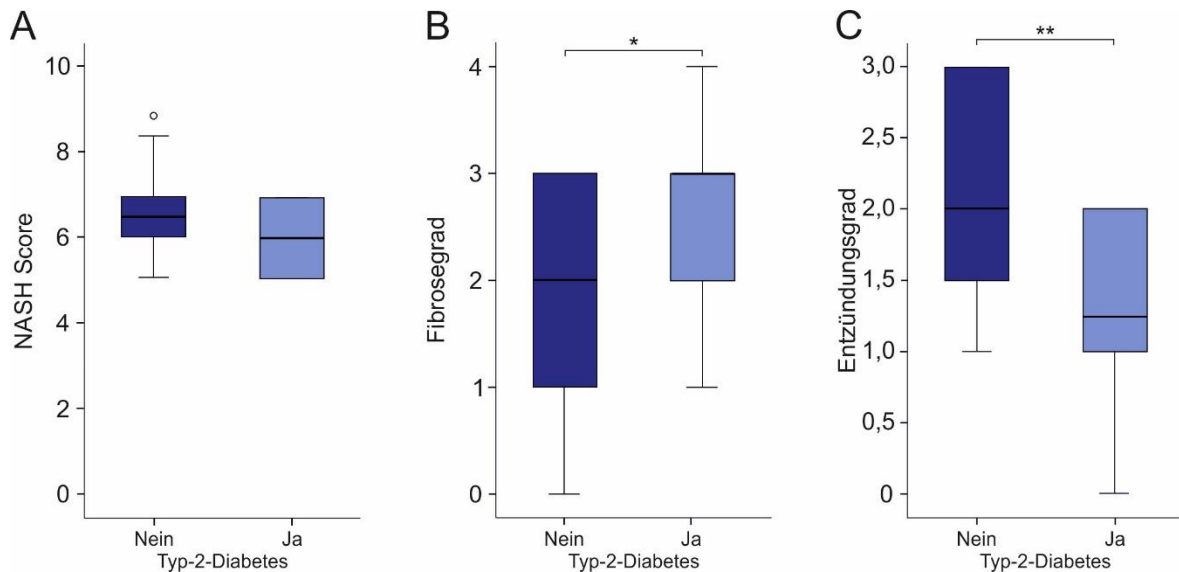


Abbildung 8: NASH-Score und NASH-Charakteristika in der NAFLD-Kohorte im Verhältnis zu Typ-2-Diabetes. A NASH-Score von NASH-Patienten ohne und mit Typ-2-Diabetes. B Fibrosegrad von NASH-Patienten ohne und mit Typ-2-Diabetes. C Entzündungsgrad von NASH-Patienten ohne und mit Typ-2-Diabetes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Um zu überprüfen, ob der Einschluss von Patienten mit Typ-2-Diabetes die in Abbildung 6 B – D dargestellten Korrelationen des SNTA-mRNA-Expressionslevels und Charakteristika der NASH sowie des NASH-Scores verfälscht haben, wurden die Assoziationen unter Ausschluss dieser Patienten erneut berechnet. Die negative Korrelation der hepatischen SNTA-mRNA-Expression blieb sowohl beim Steatosegrad ($r = -0,247$, $p = 0,019$), als auch beim Entzündungsgrad ($r = -0,429$, $p < 0,001$), dem Fibrosegrad ($r = -0,284$, $p = 0,007$) und dem NASH-Score ($r = -0,284$, $p = 0,007$) in ihrer Signifikanz stabil (siehe Abbildung 9 A - C, Daten nicht gezeigt).

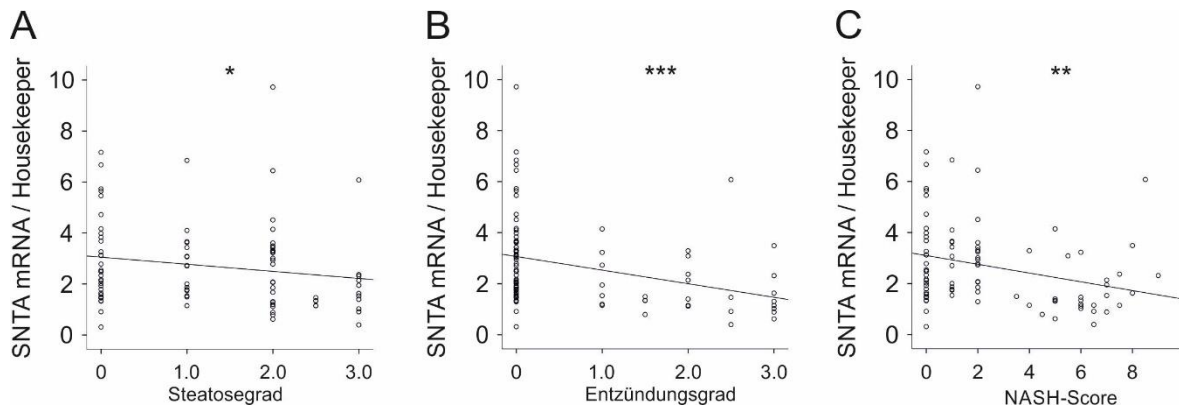


Abbildung 9: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte in Bezug auf Parameter der NASH unter Ausschluss von Typ-2-Diabetes-Patienten. A Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit dem Steatosegrad. B Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit dem Entzündungsgrad. C Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit dem NASH-Score. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.1.4 Korrelation zwischen der SNTA-, der SR-BI- und der MnSOD-mRNA-Expression

Der HDL-Rezeptor SR-BI ist in der Leber von Mäusen mit SNTA / SNTB2-Defizienz deutlich erniedrigt.

SR-BI ist an der Cholesterinaufnahme in die Leber, dem sogenannten reversen Cholesterintransport beteiligt [171, 172]. Da SR-BI über Faktoren mit einer Rolle in der NAFLD-Pathogenese reguliert wird [173], wurde geklärt, ob dessen Expression in der NAFLD verändert ist. Die hepatische SR-BI-mRNA-Expression war in der untersuchten NAFLD-Kohorte innerhalb der Gruppen vergleichbar (siehe Abbildung 10 A) [174]. Zwischen dem SR-BI-Level und dem Fibrosegrad konnte eine positive Korrelation festgestellt werden (siehe Abbildung 10 B). Weitere Parameter der NASH, wie der Steatose- und der Entzündungsgrad, als auch der NASH-Score selbst wiesen keine Korrelation mit der SR-BI-mRNA-Expression auf (siehe Abbildung 10 C und Daten nicht gezeigt) [174].

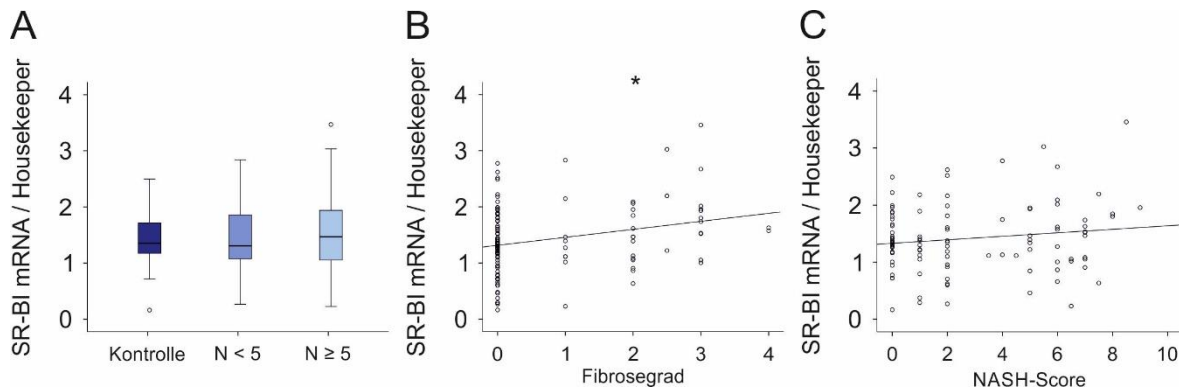


Abbildung 10: Hepatische SR-BI-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte. A SR-BI-mRNA-Expression in den Kontrollen (NASH-Score (N) =0) und den NAFLD-Patienten mit einem NASH-Score < 5 und ≥ 5 . B Korrelation der SR-BI-mRNA-Expression mit dem Fibrosegrad. C Korrelation der SR-BI-mRNA-Expression mit dem NASH-Score. * $p < 0,05$.

Zwischen der SR-BI und der SNTA-mRNA-Expression konnte eine positive Korrelation ($r = 0,606$; $p < 0,001$) verzeichnet werden (siehe Abbildung 11 A). Da das SR-BI-Level von Typ-2-Diabetes beeinflusst wurde [174], wurde die Assoziation zusätzlich auch unter Ausschluss der Typ-2-Diabetes-Patienten berechnet. Die Korrelation zwischen SR-BI und SNTA blieb aber dennoch höchst signifikant ($r = 0,601$; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 11 B).

Das Antioxidans MnSOD (*manganese-dependent superoxide dismutase*) schützt Zellen vor oxidativem Stress, indem es reaktive Sauerstoffradikale zerstört. In Adipozyten ist das MnSOD-Proteinlevel bei einem Knockdown von SNTA erniedrigt [169]. In der in dieser Studie untersuchten Kohorte war die mRNA-Expression von MnSOD sowohl in männlichen Patienten mit einer Fettleber, als auch bei Patienten mit einer NASH gegenüber der Kontrollgruppe hoch signifikant erniedrigt [175]. Zwischen der SNTA-mRNA-Expression und der MnSOD-mRNA-Expression lag keine Korrelation vor ($r = -0,068$, $p = 0,515$) (siehe Abbildung 11 C).

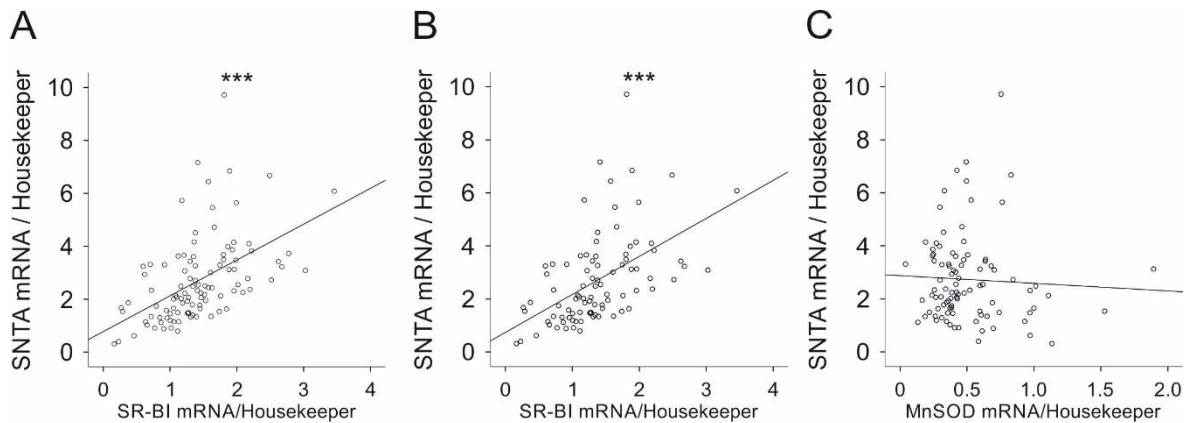


Abbildung 11: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte in Bezug auf die SR-BI- und die MnSOD-mRNA-Expression. A Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit der SR-BI-mRNA-Expression. B Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit der SR-BI-mRNA-Expression unter Ausschluss der Typ-2-Diabetes-Patienten. C Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit der MnSOD-mRNA-Expression. *** $p < 0,001$.

3.1.2 SNTA-Expression im HCC

SNTA ist in verschiedenen Karzinomen, wie dem Ösophaguskarzinom und dem Mammakarzinom, differenziell exprimiert. In dem Magenkarzinom, dem Lungenkarzinom, dem Kolonkarzinom sowie dem Rektumkarzinom konnte dies nicht gezeigt werden [103, 148]. Daher wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob SNTA auch eine Rolle bei der Karzinogenese in der Leber spielt. Im Vergleich von Nicht-Tumorgewebe und Tumorgewebe desselben Patienten zeigte sich innerhalb der untersuchten Kohorte von 21 Patienten keine stringente differenzielle SNTA-Protein-Expression (siehe Abbildung 12 A, B). Bei 13 HCC-Patienten war die SNTA-Protein-Expression im Tumor um das 2,8 (1,1 - 19,3)-fache erhöht im Vergleich zum gesunden Gewebe. Bei den restlichen acht HCC-Patienten war das SNTA-Proteinlevel um das 0,4 (0,2 - 0,9)-fache erniedrigt (siehe Abbildung 12 B). Für Diagnosezwecke kann die SNTA-Expression nicht eingesetzt werden, da diese im Verhältnis zwischen Tumor- und Nicht-Tumorgewebe weder mit dem Staging noch dem Grading der Erkrankung assoziiert vorlag (siehe Abbildung 12 C, D).

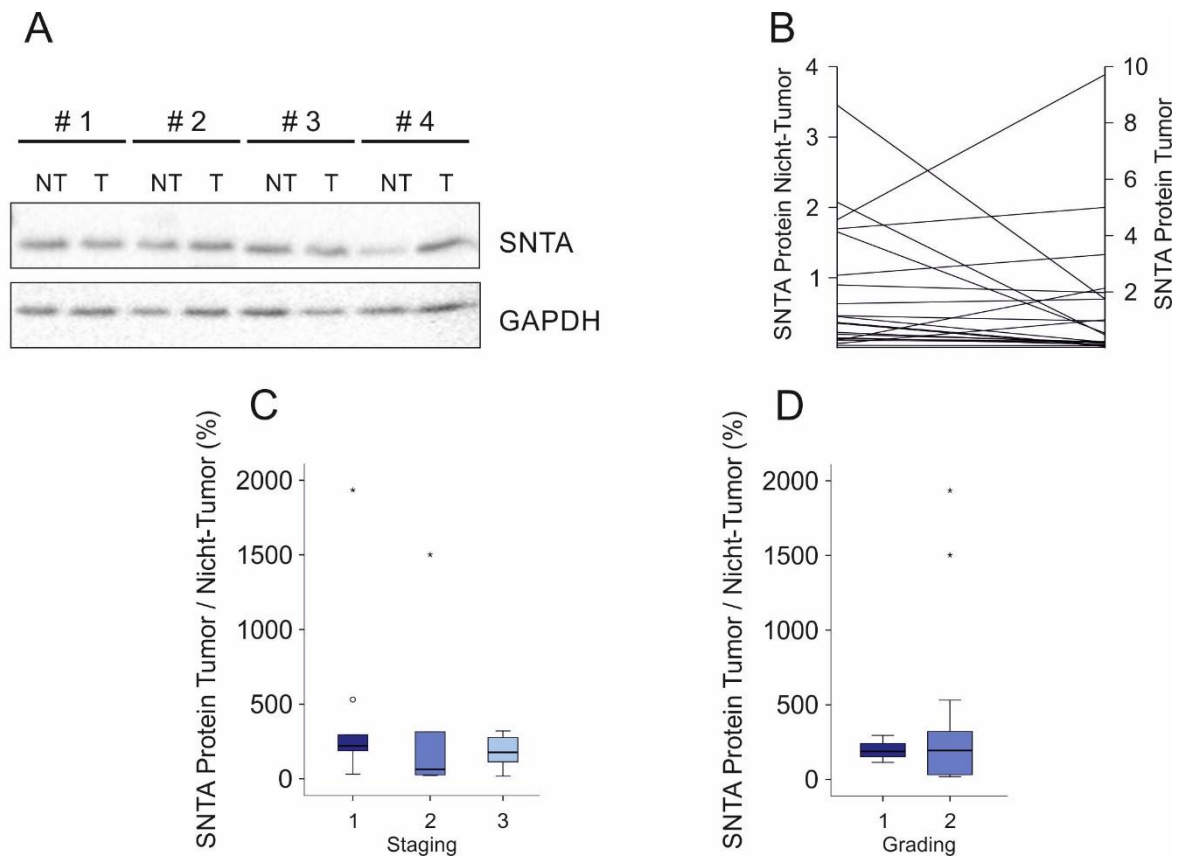


Abbildung 12: SNTA-Protein-Expression im humanen HCC. A Exemplarischer Immunoblot der SNTA-Protein-Expression im Nicht-Tumorgewebe (NT) und Tumorgewebe (T) von vier Patienten (# 1 - 4). Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der SNTA-Protein-Expression im Nicht-Tumorgewebe und Tumorgewebe. C Verhältnis der SNTA-Protein-Expression vom Tumorgewebe zum Nicht-Tumorgewebe klassifiziert nach dem Staging der Tumore. D Verhältnis der SNTA-Protein-Expression vom Tumorgewebe zum Nicht-Tumorgewebe klassifiziert nach dem Grading der Tumore. n = 21.

3.2 Syntrophine in der murinen Leber

Zur Untersuchung der Syntrophine alpha und beta2 wurden SNTA $-/-$ und SNTB2 $-/-$ Mäuse verwendet, welche einen ubiquitären Knockout des SNTA- bzw. SNTB2-Gens aufweisen. Der genetische Hintergrund der Mäuse ist C57BL/6J, ein weit verbreiteter und gut charakterisierter Inzuchtstamm für präklinische Analysen.

3.2.1 Syntrophine in der murinen NASH

Zur Induktion einer NASH im Mausmodell wurden SNTA $-/-$ und Wildtyp-Mäuse zum einen für zwei Wochen mit einer MCD-Diät und zum anderen für zwölf Wochen mit einer Paigendiät und den dazugehörigen Kontrolldiäten gefüttert. Bei der MCD-Diät kommt es zu einer Verfettung, einer Entzündung und einer beginnenden Fibrose in der Leber. Der Nachteil bei diesem Modell liegt in der starken Gewichtsreduktion der Mäuse und der

somit verbundenen Kürze der Diät [176]. In dieser kurzen Zeit können sich langwierige zelluläre Abläufe wie die Fibrose im Gewebe nicht manifestieren. Deshalb wurde die Rolle der Syntrophine in der NASH zusätzlich in einem weiteren Diätmodell, der Paigendiät, untersucht. Diese atherogene Diät bewirkt eine Steatose, Entzündung und Fibrose in der Leber [155, 175]. Eine Gewichtszunahme wird dabei aber nicht immer erzielt [155].

Die hepatische SNTA-mRNA-Expression von Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät wies im Vergleich zu den mit der Kontrolldiät gefütterten Tieren eine tendenzielle ($p = 0,082$) Erhöhung auf (siehe Abbildung 13 A). Auf Proteinebene war diese Tendenz dagegen nicht ausgeprägt ($p = 0,126$) (siehe Abbildung 13 C, D). Bei Wildtyp-Mäusen auf Paigendiät zeigte sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine hoch signifikant erhöhte SNTA-Expression (siehe Abbildung 13 B, C, E).

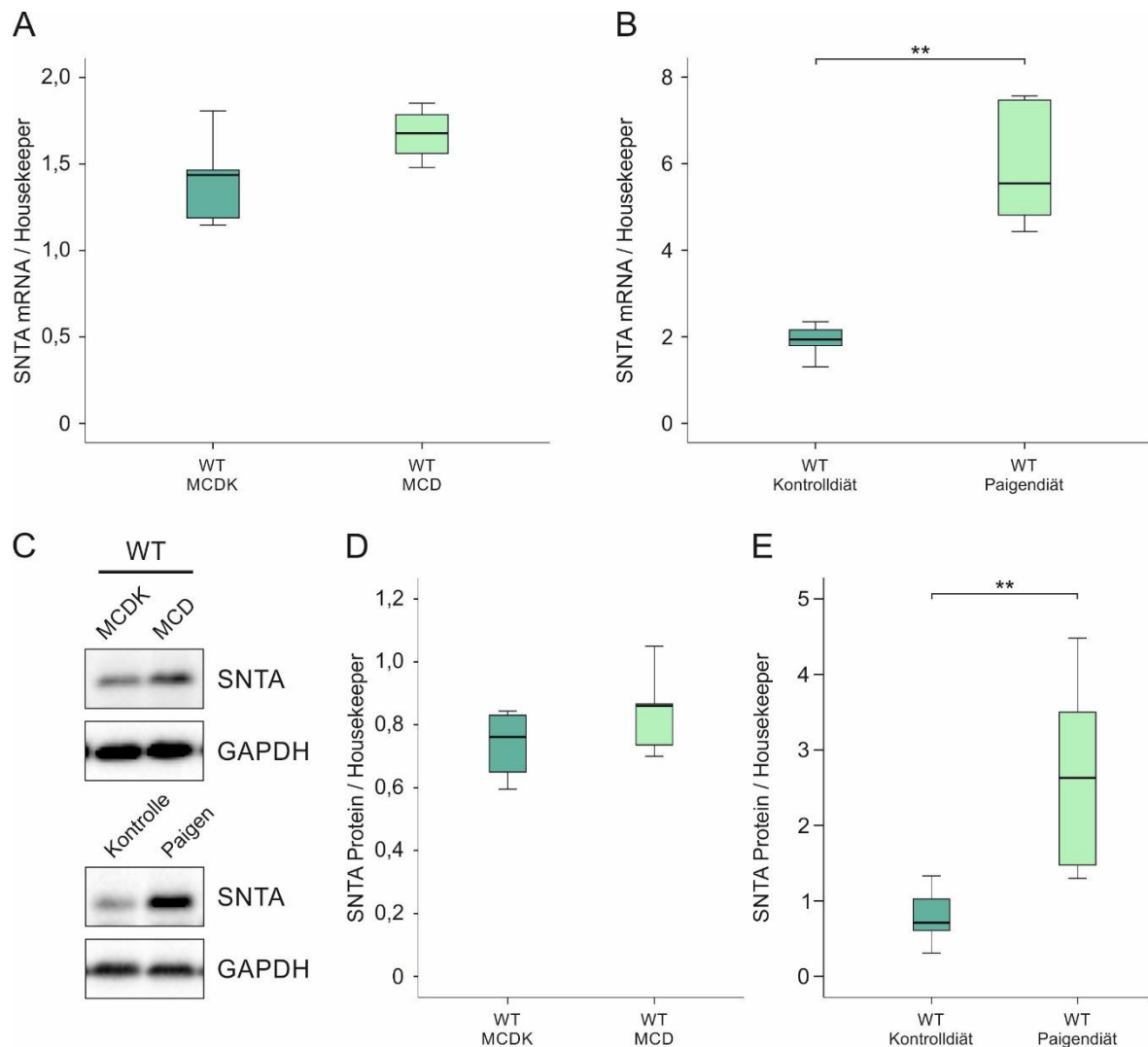


Abbildung 13: Hepatische SNTA-mRNA- und-Protein-Expression in der murinen NASH nach zweiwöchiger Methionin-Cholin-defizienter Kontroll (MCDK)- und Methionin-Cholin-defizienter (MCD)-Diät bzw. zwölfwöchiger Kontroll- und Paigendiät. A SNTA-mRNA-Expression von Wildtyp (WT)-Mäusen nach MCDK- und MCD-Diät. B SNTA-mRNA-Expression von Wildtyp-Mäusen nach Kontroll- und Paigendiät. C Exemplarischer Immunoblot der SNTA-Protein-Expression von Wildtyp-Mäusen nach MCDK- und MCD-Diät bzw. Kontroll- und Paigendiät. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. D Quantifizierung der SNTA-Protein-Expression von Wildtyp-Mäusen auf MCDK- und MCD-Diät durch densitometrische Vermessung. n = 5 - 6. E Quantifizierung der SNTA-Protein-Expression von Wildtyp-Mäusen auf Kontroll- und Paigendiät durch densitometrische Vermessung. n = 6; ** p < 0,01.

3.2.1.1 MCD-Diät und die Effekte des SNTA-Knockouts

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse hinsichtlich der Gewichtsreduktion und der NASH-spezifischen Parameter, wie Steatose, Entzündung, Fibrose und oxidativer Stress in den SNTA-Knockout-Tieren dargestellt.

3.2.1.1.1 Der Gewichtsverlust ist in den SNTA-Knockout-Tieren geringer

Die rapide Gewichtsabnahme der Mäuse auf MCD-Diät ist ein spezifisches Problem der Diät [176]. Die Nährstoff-Defizienz sorgte für eine Gewichtsreduktion von bis zu 20 % innerhalb von zwei Wochen. Sowohl das Körpergewicht der Wildtyp-Mäuse, als auch der SNTA $-/-$ Mäuse reduzierte sich auf MCD-Diät höchst signifikant gegenüber den Kontrollen auf MCDK-Diät (siehe Abbildung 14 A).

Die SNTA $-/-$ Mäuse wiesen ein niedrigeres Endgewicht bei der MCDK-Diät ($p = 0,009$) und ein höheres Endgewicht bei der MCD-Diät ($p = 0,001$) gegenüber den jeweiligen Wildtyp-Gruppen auf (siehe Abbildung 14 A). Die Diät-induzierte Gewichtsreduktion war demnach bei den SNTA $-/-$ Mäusen weniger ausgeprägt. Das Lebergewicht, welches relativ zum Körpergewicht berechnet wurde, zeigte weder bei den Wildtyp-, noch bei den SNTA $-/-$ Tieren eine Veränderung zwischen den verschiedenen Diäten oder Genotypen (siehe Abbildung 14 B). Die untersuchten intraabdominellen Fettgewebe epididymal und perirenal wiesen eine höchst signifikante ($p < 0,001$) Gewichtsreduktion bei Wildtyp-Tieren auf MCD-Diät im Vergleich zur MCDK-Diät auf. Dagegen konnte bei den SNTA $-/-$ Mäusen lediglich eine sehr schwache Tendenz zu einer Reduktion der Fettgewebe durch MCD-Diät festgestellt werden ($p = 0,16$ und $p = 0,305$) (siehe Abbildung 14 C, D). Dieselben Auswirkungen zeigten sich auch beim subkutanen Fettgewebe. Auch hier nahmen die Wildtyp-Tiere auf MCD-Diät höchst signifikant ($p < 0,001$) an Fettgewebe, im Gegensatz zu den SNTA $-/-$ Mäusen, ab (siehe Abbildung 14 E). Alle untersuchten weißen Fettgewebe lagen bei den SNTA $-/-$ Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf MCDK-Diät signifikant reduziert vor, wogegen das Gewicht der Mäuse auf MCD-Diät bei beiden Genotypen ähnlich war (siehe Abbildung 14 C - D). Das Gewicht der Milz war weder zwischen den Diäten noch zwischen den Genotypen unterschiedlich (siehe Abbildung 14 F).

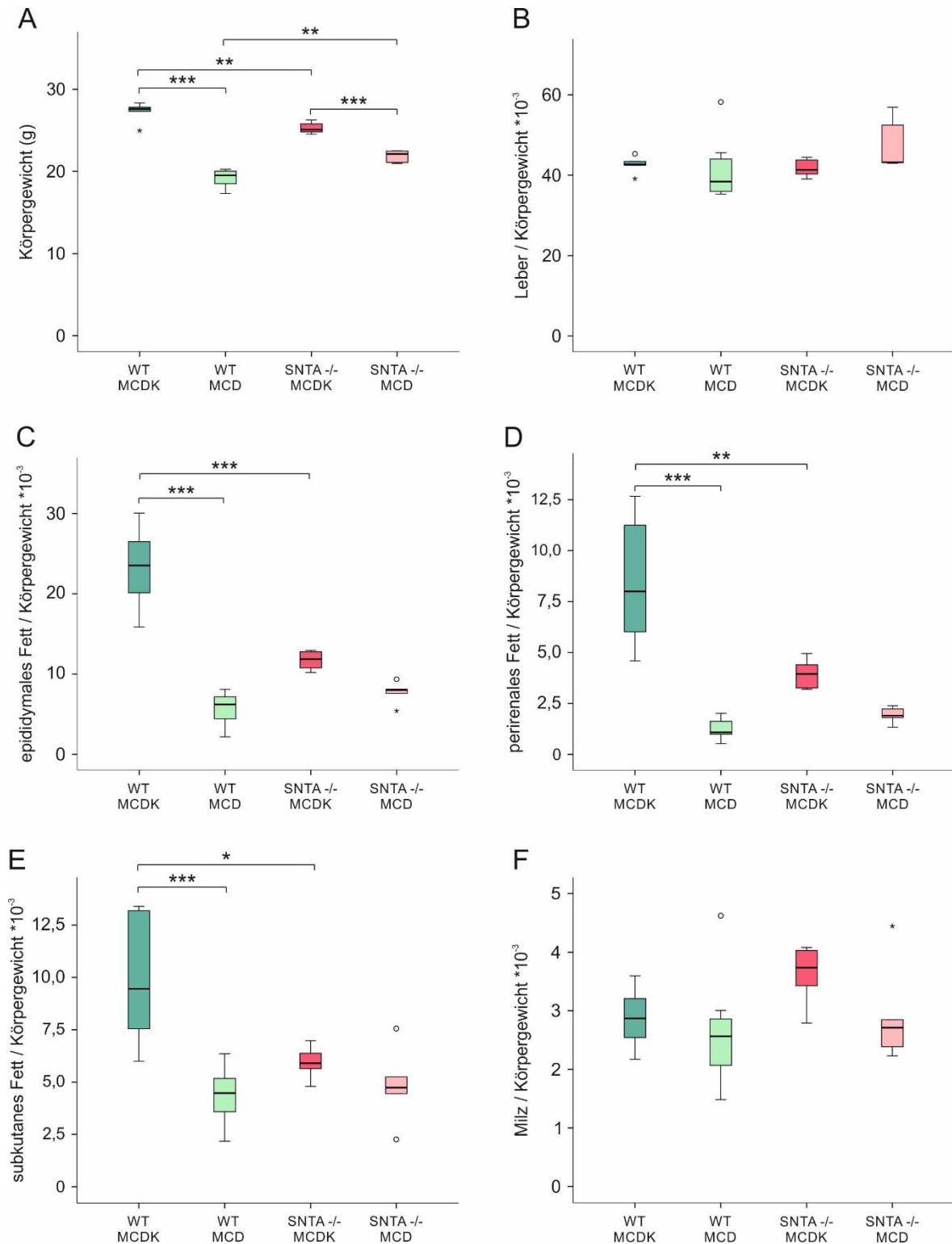


Abbildung 14: Körpergewichte und Gewichte verschiedener Gewebe von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Körpergewicht. **B** Lebergewicht. **C** Gewicht des epididymalen Fettgewebes. **D** Gewicht des perirenales Fettgewebes. **E** Gewicht des subkutanen Fettgewebes. **F** Milzgewicht. Die Normalisierung von B – F erfolgte auf das Körpergewicht. n = 5 – 6; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Adipokine sind wichtige Regulatoren von metabolischen Stoffwechselwegen, die von den Adipozyten ins Blut freigesetzt werden. Adiponektin wirkt dabei hepatoprotektiv und antiinflammatorisch und ist bei Übergewicht und NAFLD im Serum vermindert [177]. Zusätzlich ist ein erhöhter Serum-Adiponektinspiegel bei muriner und humaner Zirrhose publiziert [178]. Bei den Wildtyp-Mäusen, die durch die MCD-Diät stark an Gewicht verloren haben, zeigte sich eine höchst signifikant ($p < 0,001$) höhere Adiponektin-Konzentration, wogegen die geringe Fettgewebsreduktion bei den SNTA $-/-$ Mäusen zu keiner signifikanten Änderung des Adiponektinlevels führte. Der Unterschied zwischen den SNTA $-/-$ und den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät war höchst signifikant ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 15 A).

Des Weiteren wurde das Adipokin Chemerin gemessen. In humanen Studien wurden konträre Ergebnisse über einen erhöhten [179, 180] und einen unveränderten [181, 182] systemischen Chemerinspiegel in der NAFLD publiziert. In der Maus zeigte sich weder bei den Wildtyp-, noch bei den SNTA $-/-$ Mäusen eine signifikante Veränderung des Chemerinspiegels im Serum (siehe Abbildung 15 C).

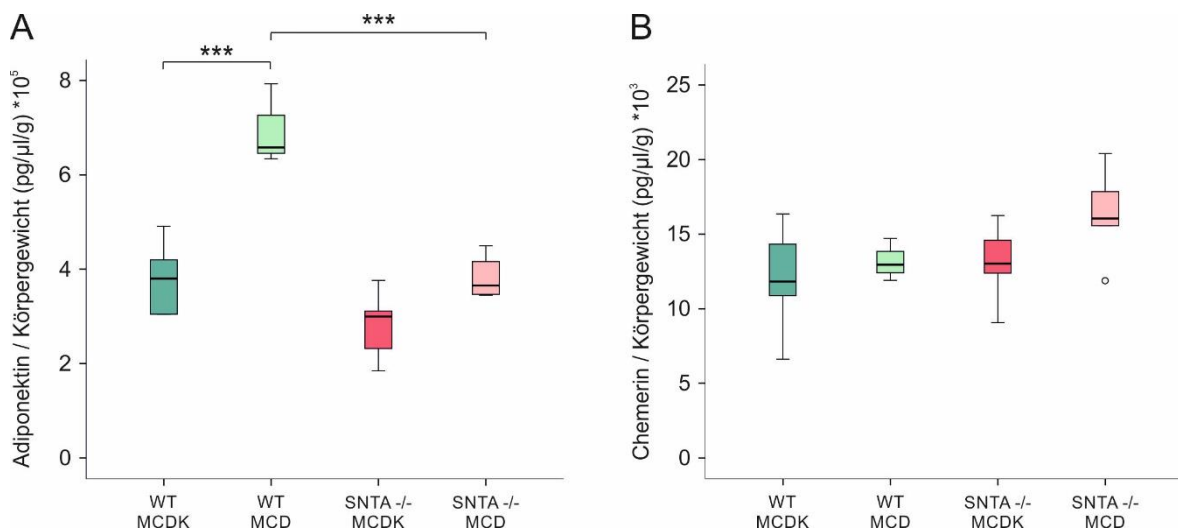


Abbildung 15: Adipokine von Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Adiponektin im Serum. B Chemerin im Serum. Die Normalisierung erfolgte auf das Körpergewicht. $n = 5 - 7$; *** $p < 0,001$.

3.2.1.1.2 Der Lipidmetabolismus wird durch den SNTA-Knockout verändert

Für die NAFLD ist eine vermehrte Speicherung von Triglyzeriden und Cholesterin in hepatischen Lipidtropfen charakteristisch. Im Folgenden wurde die Steatose histologisch und der Fettsäure- und Cholesterinmetabolismus biochemisch untersucht.

3.2.1.1.2.1 Steatosegrad

Bei der MCD-Diät entsteht die Lebersteatose aufgrund der Cholin-Defizienz, welche den Transport von Lipiden aus der Leber in den Körper verhindert. Wie die histologische Darstellung der Lebern zeigt, entwickelte sich innerhalb von zwei Wochen Fütterung sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTA $-/-$ Tieren eine Lebersteatose. Es konnte weder in der Leberhistologie, noch in der Größe oder Morphologie der Lipidtropfen ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (siehe Abbildung 16 A). Triglyzeridmessungen bestätigten eine hoch signifikante Erhöhung der Triglyzeride in den Lebern von beiden Genotypen (siehe Abbildung 16 B). Dagegen wurde nur bei den Wildtyp-Tieren im Serum eine signifikante Reduktion ($p = 0,022$) und in der Leber eine hoch signifikante Erhöhung ($p = 0,002$) des Cholesterinlevels gemessen (siehe Abbildung 16 C, D).

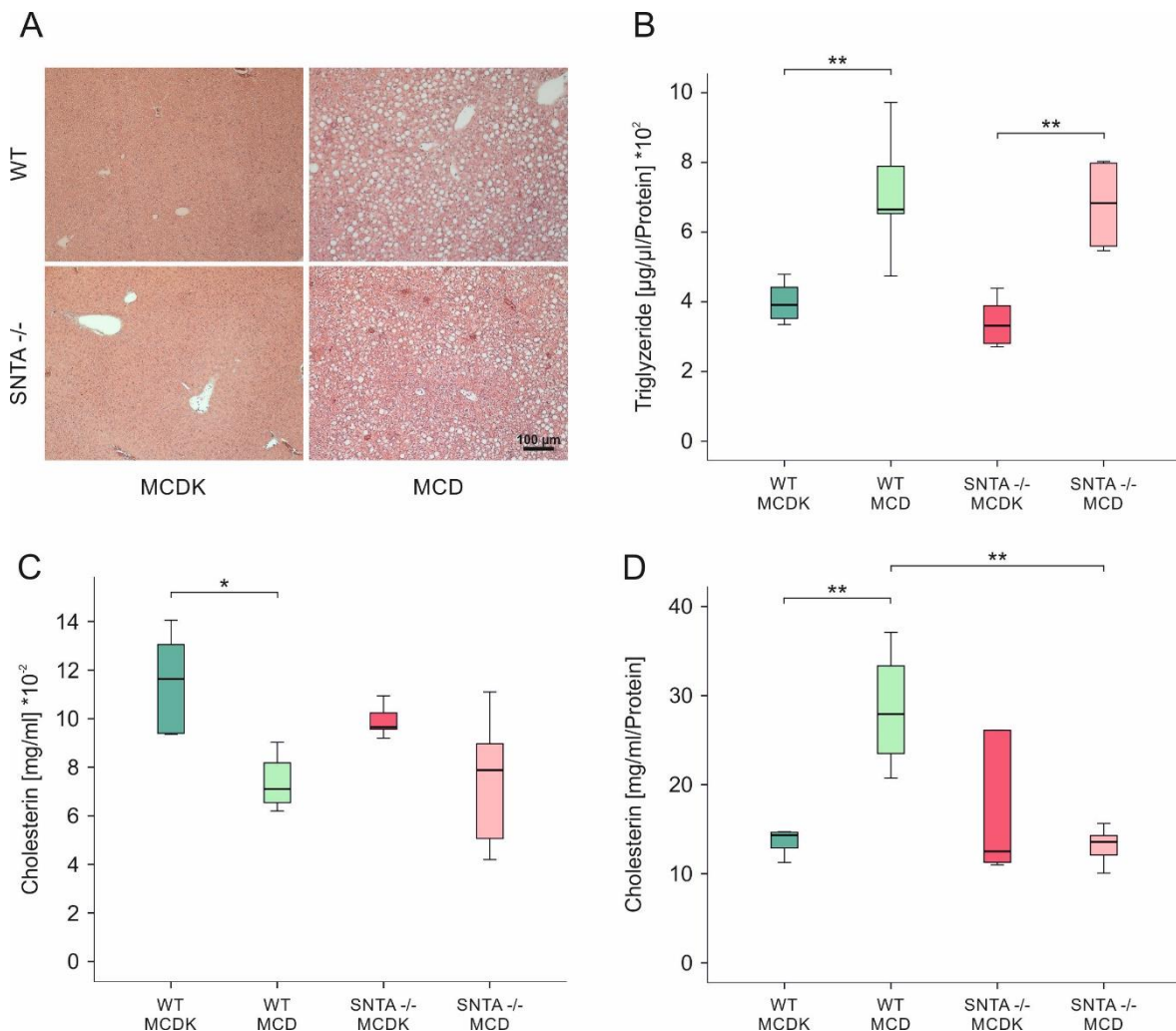


Abbildung 16: Lebersteatose von Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Hämalaun-Eosin-Färbung der Leber. B Triglyzeride in der Leber. C Cholesterin im Serum. D Cholesterin in der Leber. Die Normalisierung von B und D erfolgte auf das Gesamtprotein. $n = 5 - 7$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.1.1.2.2 Fettsäuresynthese

Einen wichtigen Regulator der Fettsäuresynthese stellt der Transkriptionsfaktor SREBP1c (*sterol regulatory element-binding protein 1*) dar [183]. Unter anderem werden durch SREBP1c SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase-1*) und FAS (*fatty acid synthase*) aktiviert. SCD1 katalysiert die Bildung von einfach ungesättigten Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren [184]. FAS ist das Schlüsselenzym in der Lipogenese und wichtig für die Speicherung von Energie [185].

Bei der MCD-Diät lag sowohl bei den Wildtyp-Mäusen, als auch bei den SNTA ^{-/-} Mäusen die Protein-Expression von SREBP1c, SCD1 und FAS im Vergleich zu der MCDK-Diät niedriger vor (siehe Abbildung 17 A). In der densitometrischen Quantifizierung ließ sich bei der SREBP1c lediglich bei den Wildtyp-Tieren eine Tendenz ($p = 0,072$) für die Reduktion berechnen (siehe Abbildung 17 B). Auch bei SCD1 und FAS stellte sich die veränderte Expression durch die MCD-Diät ausschließlich bei den Wildtyp-Tieren, nicht aber bei den SNTA ^{-/-} Tieren, als hoch ($p = 0,001$) bzw. höchst ($p < 0,001$) signifikant heraus (siehe Abbildung 17 C, D). Bei den Knockout-Mäusen lagen die p-Werte dagegen für die SCD1 bei 0,16 und für die FAS bei 0,09.

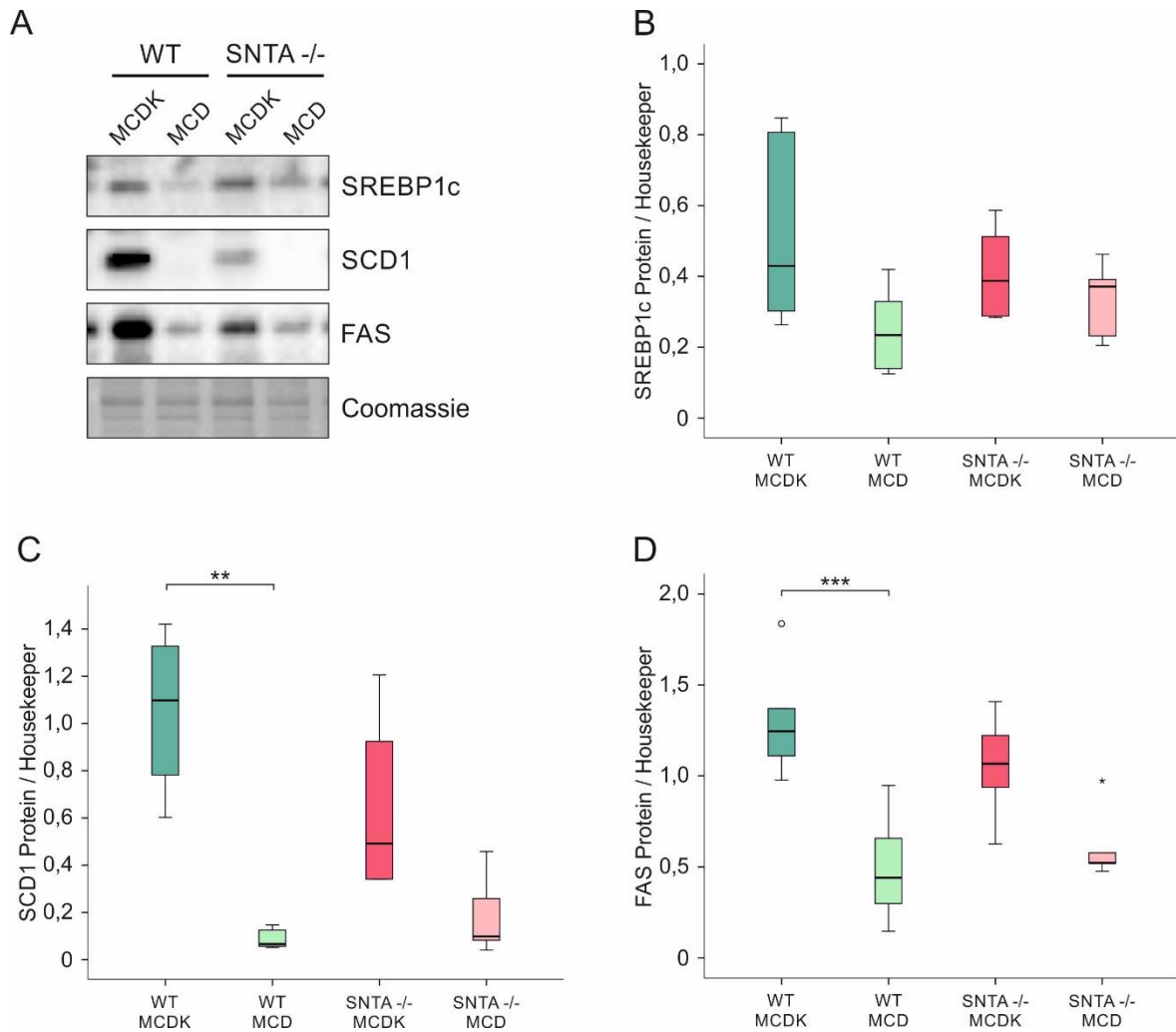


Abbildung 17: Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Exemplarischer Immunoblot der SREBP1c-, SCD1- und FAS-Protein-Expression. Die Coomassie-Färbung diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der SREBP1c-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. C Quantifizierung der SCD1-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. D Quantifizierung der FAS-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. n = 5 – 7; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.2.1.1.2.3 Cholesterinmetabolismus

In Bezug auf den Cholesterinmetabolismus wurde die Expression verschiedener Proteine, die diesen Stoffwechselweg regulieren, untersucht. ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Wachstums- und Differenzierungssignalwegen, wie auch dem Cholesterinmetabolismus und wird durch Phosphorylierung aktiviert [186]. Lediglich bei den Knockout-Mäusen war die Protein-Expression von phospho-ERK1/2 auf MCD-Diät im Vergleich zur MCDK-Diät hoch signifikant (p = 0,007) niedriger (siehe Abbildung 18 A, B).

Der HDL-Rezeptor SR-BI ist ein wichtiges Bindeglied des reversen Cholesterintransports und sorgt für die Rückführung von HDL-Cholesterin in die Leber [171, 172]. Zur Lokalisation und Expression ist PDZK1 notwendig [187]. Weder im Vergleich zwischen den beiden Diäten, noch im Vergleich der beiden Genotypen, war die Protein-Expression von SR-BI oder von PDZK1 verändert (siehe Abbildung 18 A, C, D).

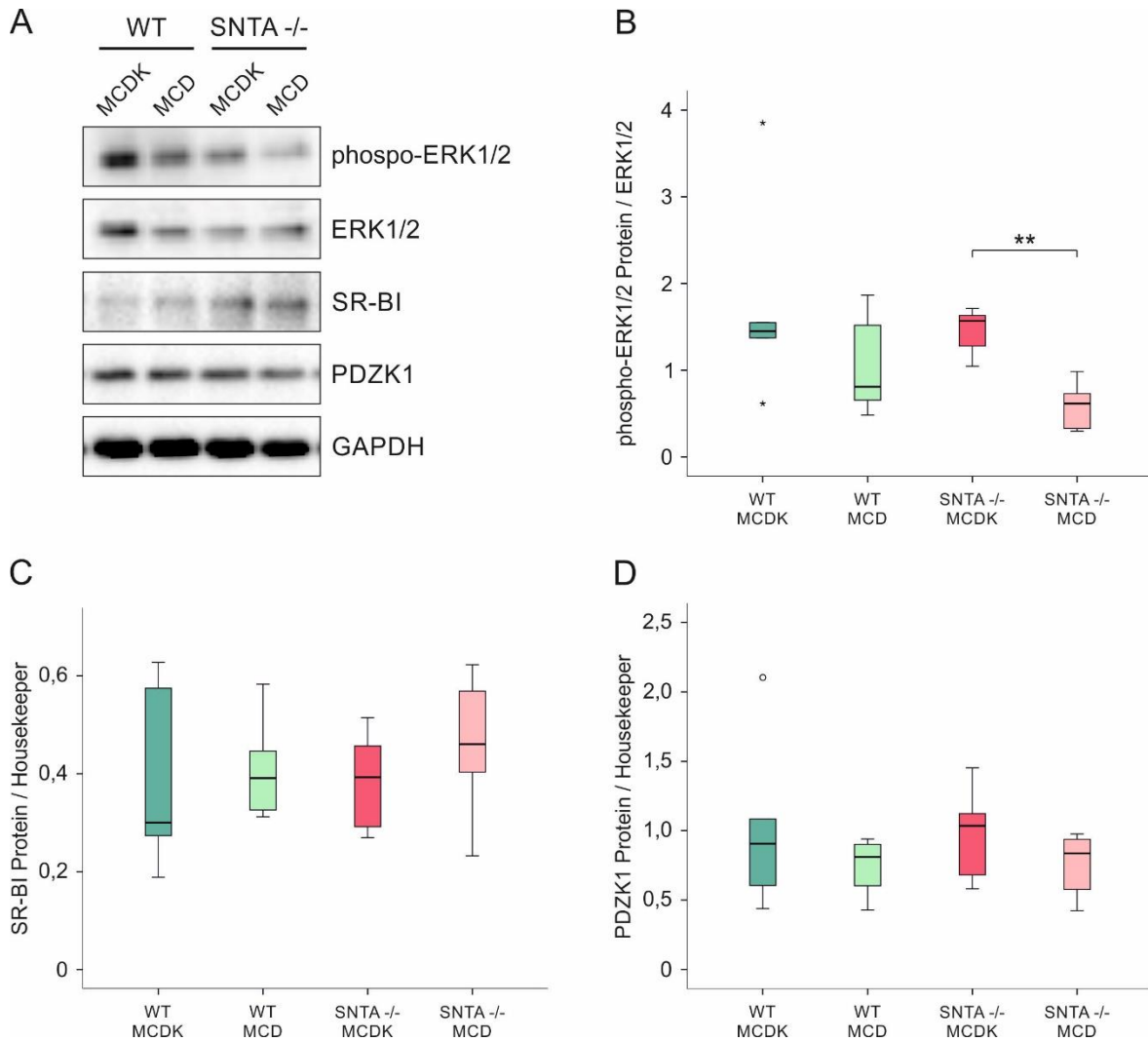


Abbildung 18: Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Exemplarischer Immunoblot der ERK1/2-, phospho-ERK1/2-, SR-BI- und PDZK1-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der phospho-ERK1/2-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. C Quantifizierung der SR-BI-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. D Quantifizierung der PDZK1-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. n = 5 – 7; ** p < 0,01.

3.2.1.1.3 Schutz vor einer hepatischen Entzündung durch den SNTA-Knockout

Als weiterer Parameter der NASH gilt die Entzündung in der steatotischen Leber, die mit der Aktivierung des Immunsystems einhergeht. Im Mausmodell wurde die Expression verschiedener Gene, die von Zellen des Immunsystems synthetisiert werden, untersucht.

Als inflammatorische Makrophagenmarker gelten F4/80 und CD68 (*cluster of differentiation*) [188]. Die hepatische mRNA-Expression dieser beiden Entzündungsmarker war ausschließlich bei Wildtyp-Tieren auf MCD-Diät hoch signifikant ($p = 0,004$ und $p = 0,007$) erhöht, nicht aber bei den SNTA $-/-$ Mäusen. Der Unterschied zwischen den SNTA $-/-$ und den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät lag bei F4/80 hoch signifikant ($p = 0,009$) und bei CD68 signifikant ($p = 0,041$) vor (siehe Abbildung 19 A, B). Der SNTA-Knockout schützt somit die Mäuse vor einer MCD-Diät-induzierten Entzündung. Bestätigt wurde dies durch eine immunhistochemische Färbung des Makrophagenmarkers CD163 [189], wobei die CD163 positiven Zellen hauptsächlich in den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät auftreten (siehe Abbildung 19 C).

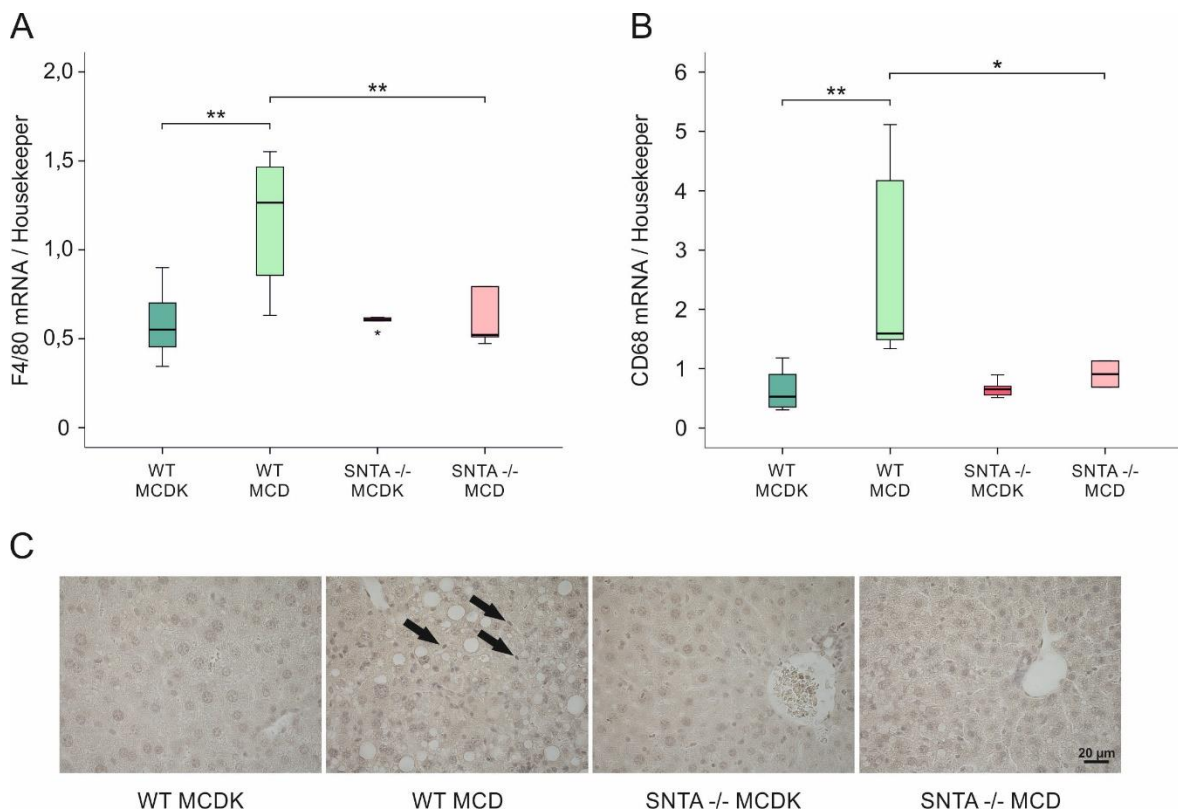


Abbildung 19: Hepatische Expression von Makrophagengenen in Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A F4/80-mRNA-Expression. B CD68-mRNA-Expression. C Immunhistochemische CD163-Färbung der Leber. Pfeile zeigen die CD163 positiven Makrophagen an. $n = 5 - 7$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Neben den Makrophagen wurden auch die T-Lymphozyten als weitere wichtige Zellart des Immunsystems untersucht. Dabei können die T-Zellen in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden. Eine davon sind die natürlichen Killer-T-Zellen. Als Marker für diese wurde die mRNA-Expression von Ly49C (*killer cell lectin-like receptor subfamily A*) und NCR1 (*natural cytotoxicity triggering receptor 1*) quantifiziert [190, 191]. Es zeigte sich weder im Vergleich der verschiedenen Diäten, noch im Vergleich der unterschiedlichen Genotypen eine differenzielle Expression dieser beiden Immunzellmarker (siehe Abbildung 20 A, B). Eine weitere Subpopulation der Lymphozyten stellen die CD4⁺-T-Helferzellen dar. Diese sind auf MCD-Diät sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTA ^{-/-} Tieren höchst ($p < 0,001$) bzw. hoch ($p = 0,001$) signifikant reduziert exprimiert (siehe Abbildung 20 C). Dagegen ließ sich bei den CD8⁺-zytotoxischen-T-Zellen keine differenzielle Expression feststellen (siehe Abbildung 20 D).

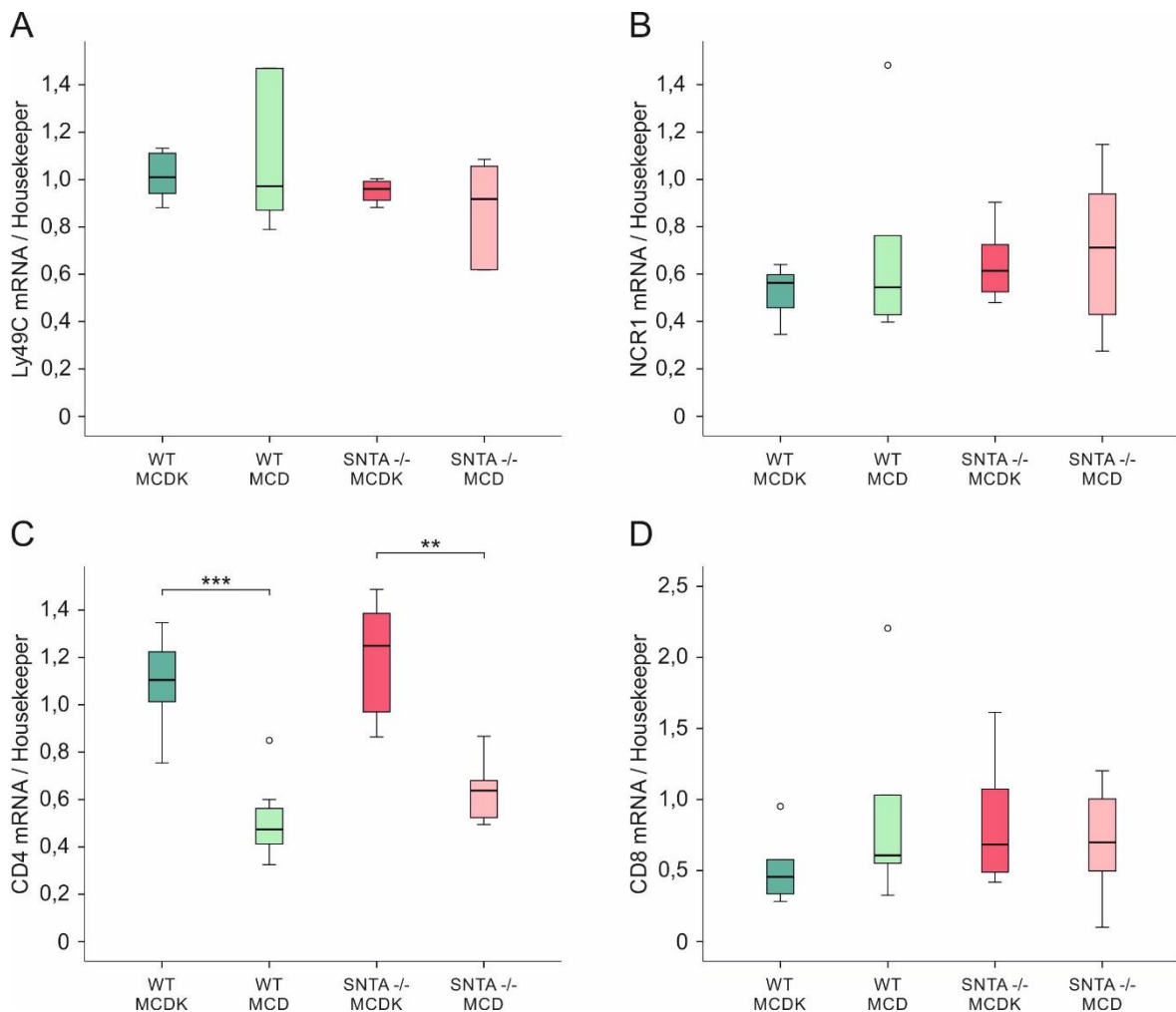


Abbildung 20: Hepatische Expression von Lymphozytengenen in Wildtyp (WT)- und SNTA ^{-/-} Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Ly49C-mRNA-Expression. B NCR1-mRNA-Expression. C CD4-mRNA-Expression. D CD8-mRNA-Expression. n = 5 - 7; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$.**

3.2.1.1.4 Schutz vor entstehender Fibrose durch den SNTA-Knockout

Die hepatische Entzündung in der NASH bewirkt die Aktivierung der hepatischen Sternzellen. Diese vermehren sich und lagern Kollagen in die Leber ein. Die Fibrosierung wurde mittels verschiedener Fibrosemarker, wie TGF β (*transforming growth factor beta*), CTGF (*connective tissue growth factor*) und α SMA (*alpha smooth muscle actin*), sowie einer Sirius-Red-Färbung untersucht.

Die mRNA-Expression von TGF β lag bei den Wildtyp-Tieren auf MCD-Diät im Vergleich zur MCDK-Diät hoch signifikant ($p = 0,001$) erhöht vor. Bei den SNTA $-/-$ Mäusen zeigte sich dagegen keine derartige Unterschiede in der Expression ($p = 1,0$) (siehe Abbildung 21 A). Dasselbe galt für die CTGF-mRNA-Expression. Dabei lag ebenfalls lediglich bei den Wildtyp-Tieren eine höchst signifikant ($p < 0,001$) erhöhte Expression bei der MCD-Diät vor. Der Unterschied zwischen den SNTA $-/-$ und den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät wies dabei eine Signifikanz auf ($p = 0,046$) (siehe Abbildung 21 B). Histologisch sollte die Fibrose mit Hilfe der Sirius-Red-Färbung, welche die Kollagenfasern anfärbt, analysiert werden. Diese konnte aber weder bei den SNTA $-/-$ Mäusen, noch bei den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (siehe Abbildung 21 C). Auch die α SMA-Expressionsanalyse zeigte keine signifikanten Veränderungen (siehe Abbildung 21 D).

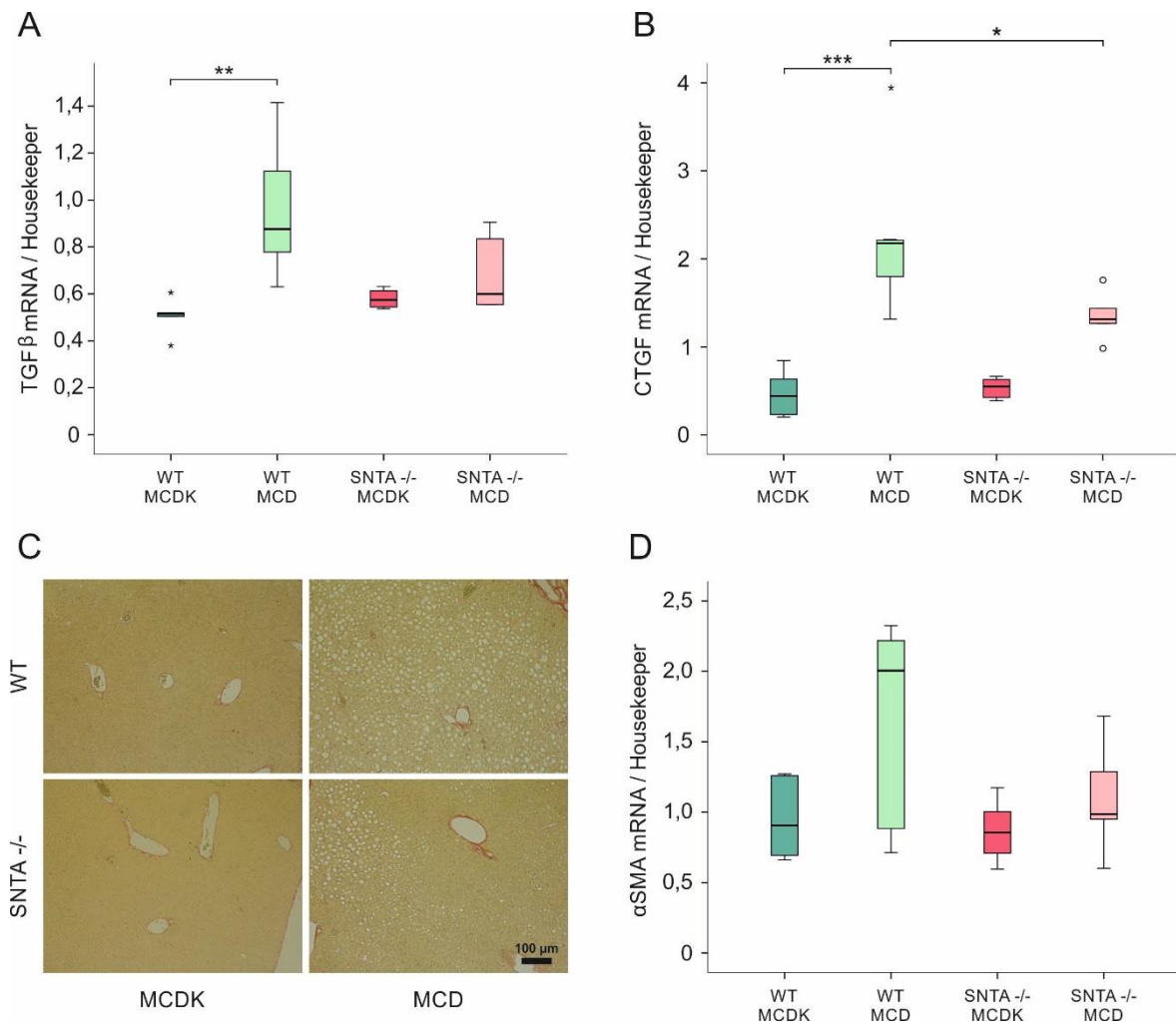


Abbildung 21: Hepatische Fibrose von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A TGFβ-mRNA-Expression. B CTGF-mRNA-Expression. C Sirius-Red-Färbung der Leber. D αSMA-mRNA-Expression. n = 5 - 7; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

SMAD3 ist eines der zahlreichen Proteine die an der TGFβ Signaltransduktion beteiligt sind [192]. SMAD3 bindet an die Erbin-PDZ Domäne und könnte auch durch SNTA stabilisiert werden. Allerdings war die SMAD3-Protein-Expression in den Lebern der SNTA -/- Tiere nicht verändert. Es zeigte sich auch keine Regulation durch die Verfütterung der MCD-Diät (siehe Abbildung 22 A, B). Ebenfalls war die Protein-Expression von c-JUN und JNK (c-Jun N-terminal kinase), die bei zellulärem Stress aktiviert werden, weder durch die Diät noch den Genotyp beeinflusst. Allerdings muss hier noch geklärt werden ob sich Unterschiede in der Aktivierung dieser Moleküle finden (siehe Abbildung 22 A, C, D).

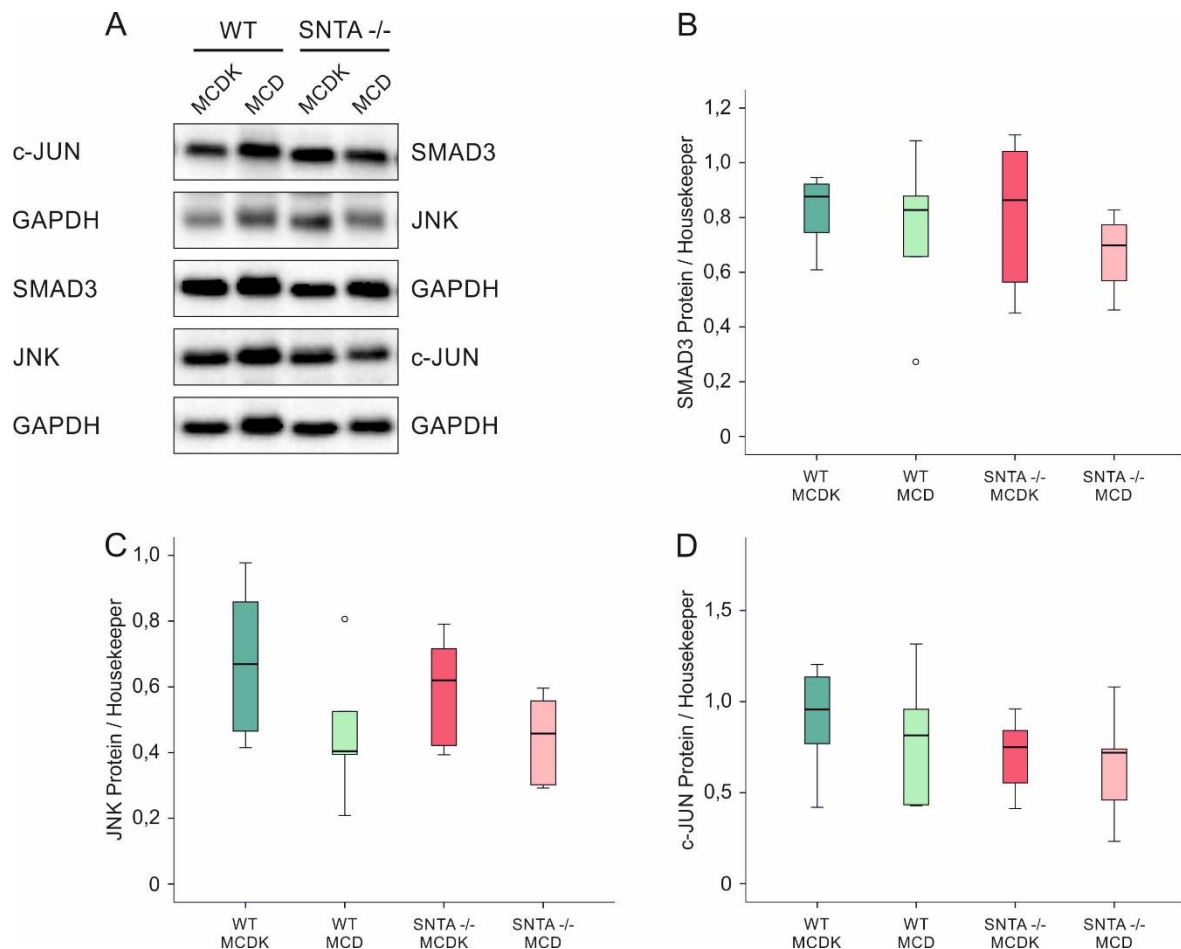


Abbildung 22: Hepatische Expression von SMAD3, c-JUN und JNK in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Exemplarischer Immunoblot der SMAD3-, c-JUN- und JNK-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der SMAD3-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. C Quantifizierung der JNK-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. D Quantifizierung der c-Jun-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. n = 5 - 7.

3.2.1.1.5 Schutz vor oxidativem Stress durch den SNTA-Knockout

Oxidativer Stress begünstigt die Entstehung und Progression der NAFLD. Durch die Verfütterung der MCD-Diät wird aufgrund der Methionin-Defizienz, welches ein wichtiges Ausgangsprodukt für Antioxidantien ist, oxidativer Stress in der Leber ausgelöst [193].

Im Mausmodell wurde der oxidative Stress über die Lipidperoxidation und des dabei entstehenden Beiprodukts MDA bestimmt. Es konnte eine Tendenz ($p = 0,089$) des erhöhten oxidativen Stresses lediglich bei den Wildtyp-Tieren verzeichnet werden. Dagegen konnte zwischen den Genotypen auf MCD-Diät ein signifikanter Unterschied detektiert werden (siehe Abbildung 23 A). Die Protein-Expressionsanalyse von MnSOD, einem Antioxidans, zeigte keine signifikanten Ergebnisse (siehe Abbildung 23 B, C).

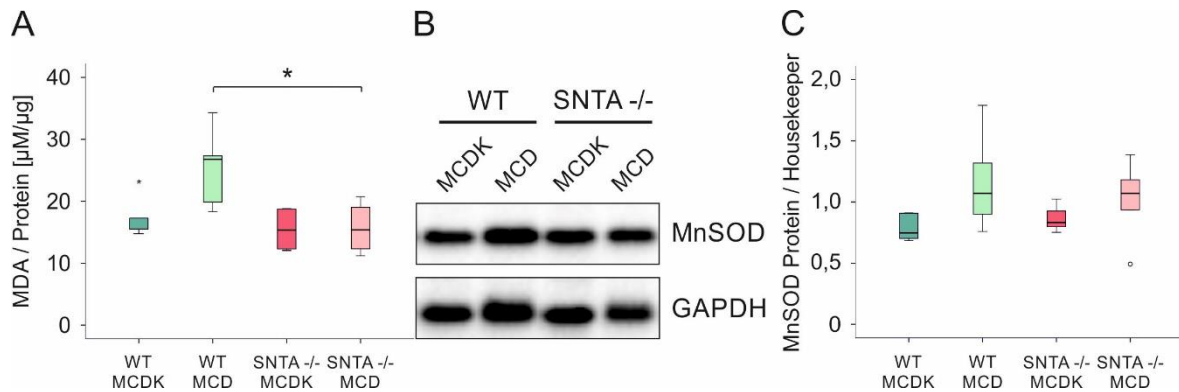


Abbildung 23: Hepatischer Oxidativer Stress von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zweiwöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Malondialdehyd (MDA)-Konzentration. Die Normalisierung erfolgte auf das Gesamtprotein der Leberlysate. B Exemplarischer Immunoblot der MnSOD-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. C Quantifizierung der MnSOD-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. $n = 5 - 7$; * $p < 0,05$.

3.2.1.2 MCD-Diät und die Effekte des SNTB2-Knockouts

Um zu überprüfen, ob SNTB2 ähnlich wie SNTA eine Rolle in der NASH assoziierten hepatischen Entzündung zeigt, wurden SNTB2 -/- Mäuse ebenfalls für zwei Wochen mit der MCD- bzw. der entsprechenden MCDK-Diät gefüttert. Es wurden die Gewichtsreduktion und die NASH-spezifischen Parameter Entzündung, Fibrose und oxidativer Stress in der Leber untersucht.

3.2.1.2.1 Der Gewichtsverlust wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert

Nach zwei Wochen MCD-Diät zeigte sich sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTB2 -/- Tieren eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Gewichtsreduktion. Die Knockout-Mäuse wogen aber auf MCD-Diät hoch signifikant ($p = 0,005$) mehr als die Wildtyp-Tiere (siehe Abbildung 24 A). Das Lebergewicht war dagegen genotypspezifisch und auch diätspezifisch unverändert (siehe Abbildung 24 B). Das Gewicht aller drei präparierten Fettdepots, epididymal, perirenal und subkutan, war bei den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät im Vergleich zur MCDK-Diät im gleichen Maße höchst signifikant ($p < 0,001$) verringert (siehe Abbildung 24 C, D). Die Gewichtsreduktion lag bei den SNTB2 -/- Tieren im epididymalen Fettgewebe hoch signifikant ($p = 0,004$) und im perirenal ($p = 0,031$) und subkutanen Fettgewebe ($p = 0,012$) signifikant (siehe Abbildung 24 E) vor. Das Milzgewicht zeigte lediglich bei den SNTB2 -/- Mäusen eine signifikante Reduktion auf MCD-Diät im Vergleich zur MCDK-Diät (siehe Abbildung 24 F).

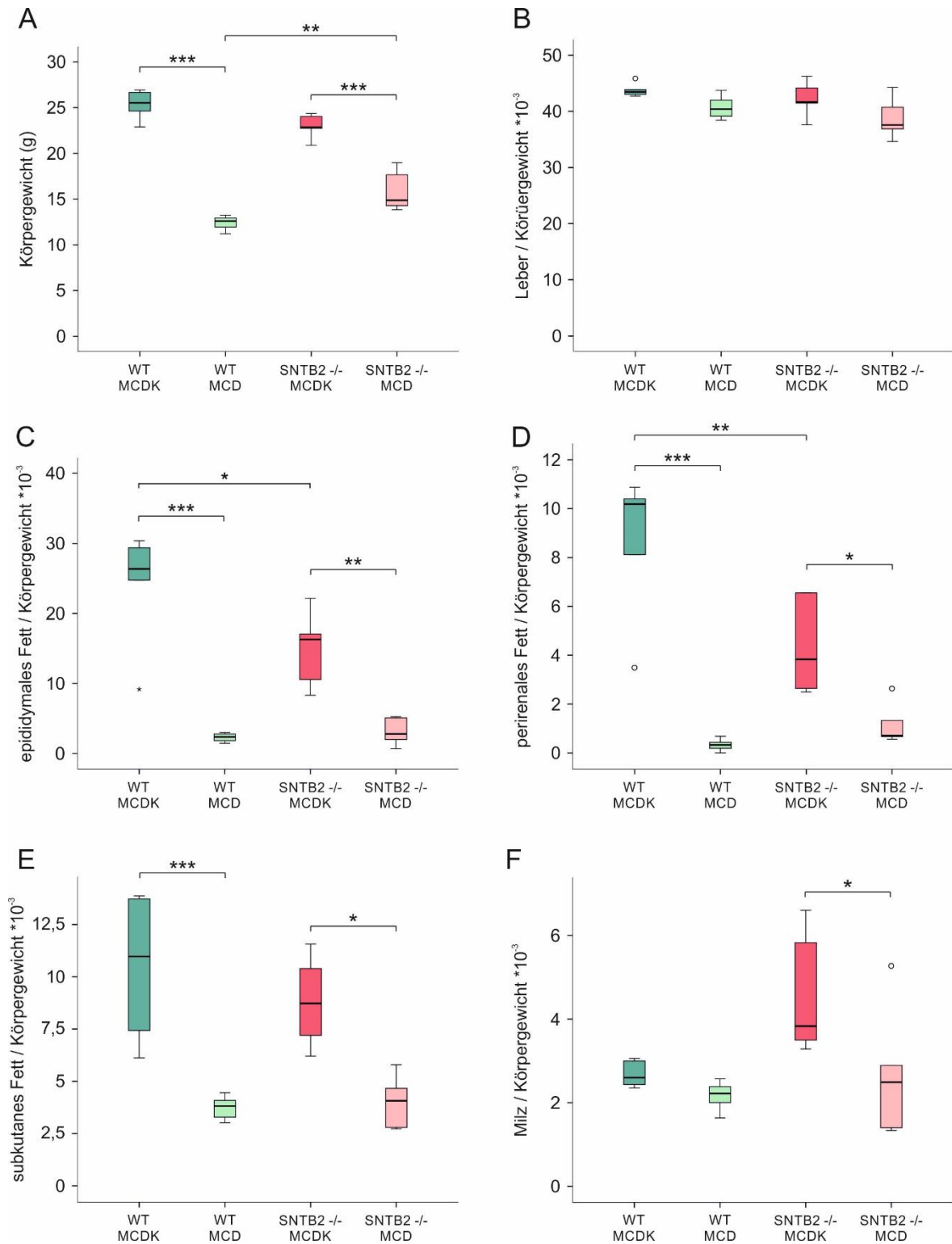


Abbildung 24: Körpergewichte und Gewichte verschiedener Gewebe von Wildtyp (WT)- und SNTB2 -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A Körpergewicht. **B** Lebergewicht. **C** Gewicht des epididymalen Fettgewebes. **D** Gewicht des perirenales Fettgewebes. **E** Gewicht des subkutanen Fettgewebes. **F** Milzgewicht. Die Normalisierung von B – F erfolgte auf das Körpergewicht. n = 5 – 7; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.2.1.2.2 Die Entzündung wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert

Als Marker der MCD-Diät-induzierten Entzündung wurde die Expression der Makrophagengene F4/80 und CD68 überprüft. Die Expression von F4/80 zeigte weder bei Wildtyp-, noch bei SNTB2 ^{-/-} Mäusen eine signifikante Erhöhung in der NASH (siehe Abbildung 25 A). Die CD68-mRNA-Expression war sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTB2 ^{-/-} Tieren auf MCD-Diät im Vergleich zur MCDK-Diät im gleichen Maße höchst signifikant ($p < 0,001$) induziert (siehe Abbildung 25 B).

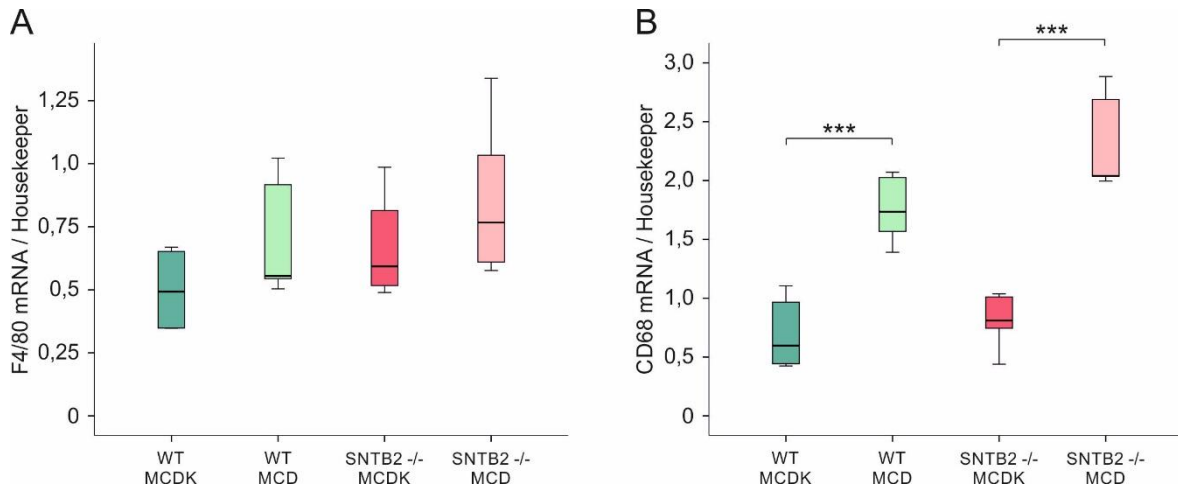


Abbildung 25: Hepatische Expression von Makrophagengenen in Wildtyp (WT)- und SNTB2 ^{-/-} Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A F4/80-mRNA-Expression. B CD68-mRNA-Expression. n = 5 - 7; * $p < 0,001$.**

3.2.1.2.3 Die Fibrose wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert

Die Fibrose wurde mit Hilfe des Expressionslevels der Fibrosemarker TGF β und α SMA bewertet. Dabei konnte bei beiden Markern im Vergleich zur MCDK-Diät eine hoch bzw. höchst signifikant höhere mRNA-Expression durch die Fütterung der MCD-Diät im Wildtyp-, als auch im Knockout-Tier detektiert werden (siehe Abbildung 26).

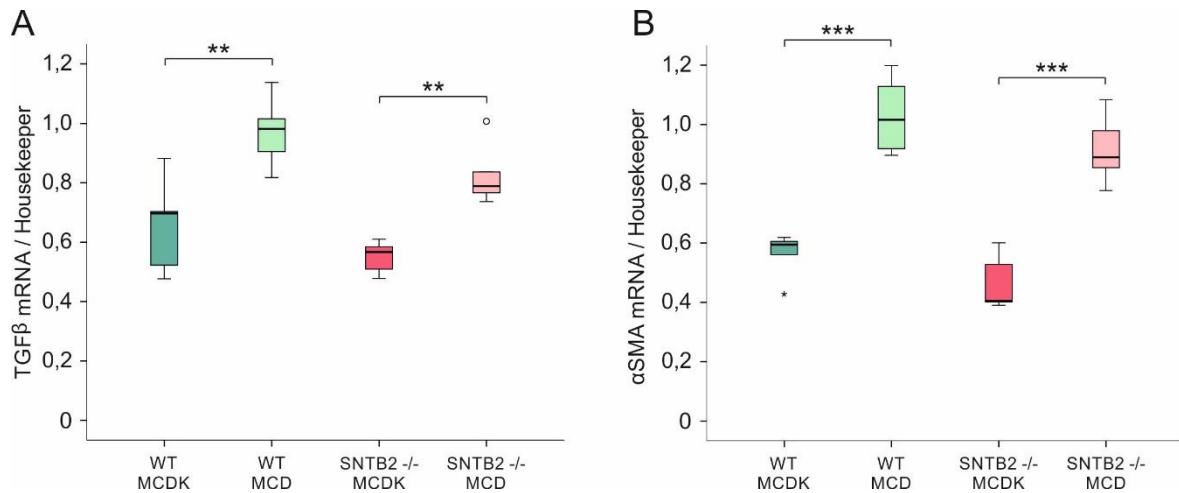


Abbildung 26: Hepatische Fibrose von Wildtyp (WT)- und SNTB2 -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A TGFβ-mRNA-Expression. B αSMA-mRNA-Expression. n = 5 - 7; ** p < 0,01; * p < 0,001.**

3.2.1.2.4 Der Oxidative Stress wird durch den SNTB2-Knockout nicht verändert

Die Lipidperoxidation, welche als Parameter für oxidativen Stress gilt, wurde mittels des MDA, einem Produkt daraus, gemessen. Es zeigten sich weder im Vergleich der verschiedenen Diäten, noch im Vergleich der verschiedenen Genotypen signifikante Ergebnisse. Lediglich zwischen den Wildtyp- und den SNTB2 -/- Mäusen auf MCDK-Diät lag tendenziell (p = 0,054) weniger oxidativer Stress bei den Knockout-Tieren vor (siehe Abbildung 27).

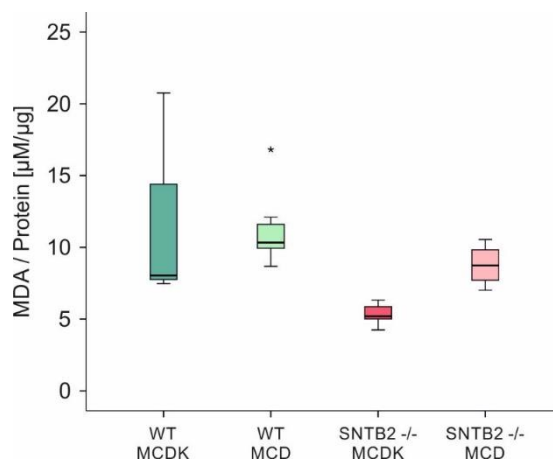


Abbildung 27: Hepatischer Oxidativer Stress von Wildtyp (WT)- und SNTB2 -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. Malondialdehyd (MDA)-Konzentration. Die Normalisierung erfolgte auf das Gesamtprotein der Leberlysate. n = 5 - 7.

3.2.1.3 Paigendiät und die Effekte des SNTA-Knockouts

Da die MCD-Diät als NASH-Modell neben seinen Vorteilen auch Nachteile aufweist wurde die Rolle von SNTA in der NASH auch noch in einem weiteren Diät Modell untersucht -der atherogenen Paigendiät. Dabei wurde die Gewichtszunahme, die hepatische Steatose, Entzündung, Fibrose und der oxidative Stress ermittelt.

3.2.1.3.1 Die Gewichtszunahme wird durch den SNTA-Knockout teilweise reduziert

Die atherogene Paigendiät besteht zu 30,1 % aus Fett. Bei den Wildtyp-Tieren verdoppelten sich die untersuchten Fettgewebe innerhalb der zwölf-wöchigen Fütterung im Vergleich zur Kontrolldiät mit einem Fettanteil von 4,1 %. Dagegen haben die SNTA -/- Mäuse im Vergleich zum Wildtyp im perirenal und subkutanen Fettgewebe durch die Paigendiät tendenziell weniger an Gewicht zugenommen. Im epididymalen Fettgewebe war dieser Effekt sogar hoch signifikant ($p = 0,008$) (siehe Abbildung 28 A). Allerdings zeigten die Tiere beider Genotypen keine Veränderungen des Gesamtkörpergewichts (siehe Abbildung 28 B).

Das Adipokin Adiponektin, welches bei Gewichtszunahme vermindert wird, lag in den Seren der Mäuse auf Paigendiät erniedrigt vor. Bei den Wildtyp-Tieren handelte es sich dabei um einen höchst signifikanten ($p < 0,001$) Unterschied zwischen Paigendiät und Kontrolldiät. Dagegen war bei den SNTA -/- Mäusen lediglich eine schwache Tendenz ($p = 0,178$) zu verzeichnen. Zusätzlich war der Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Tieren nach Fütterung der Kontrolldiät höchst signifikant ($p < 0,001$). Die SNTA -/- Mäuse wiesen bei normaler Ernährung weniger Adiponektin im Serum auf (siehe Abbildung 28 C).

Das Adipokin Chemerin, welches bei Übergewicht im Serum ansteigt, war sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTA -/- Tieren auf Paigendiät hoch ($p = 0,002$) bzw. höchst ($p < 0,001$) signifikant erhöht. Zwischen den beiden Genotypen, welche mit Kontrolldiät gefüttert wurden, zeigte sich ein hoch signifikant ($p = 0,004$) niedrigeres Chemerinlevel bei den Knockout-Tieren (siehe Abbildung 28 D).

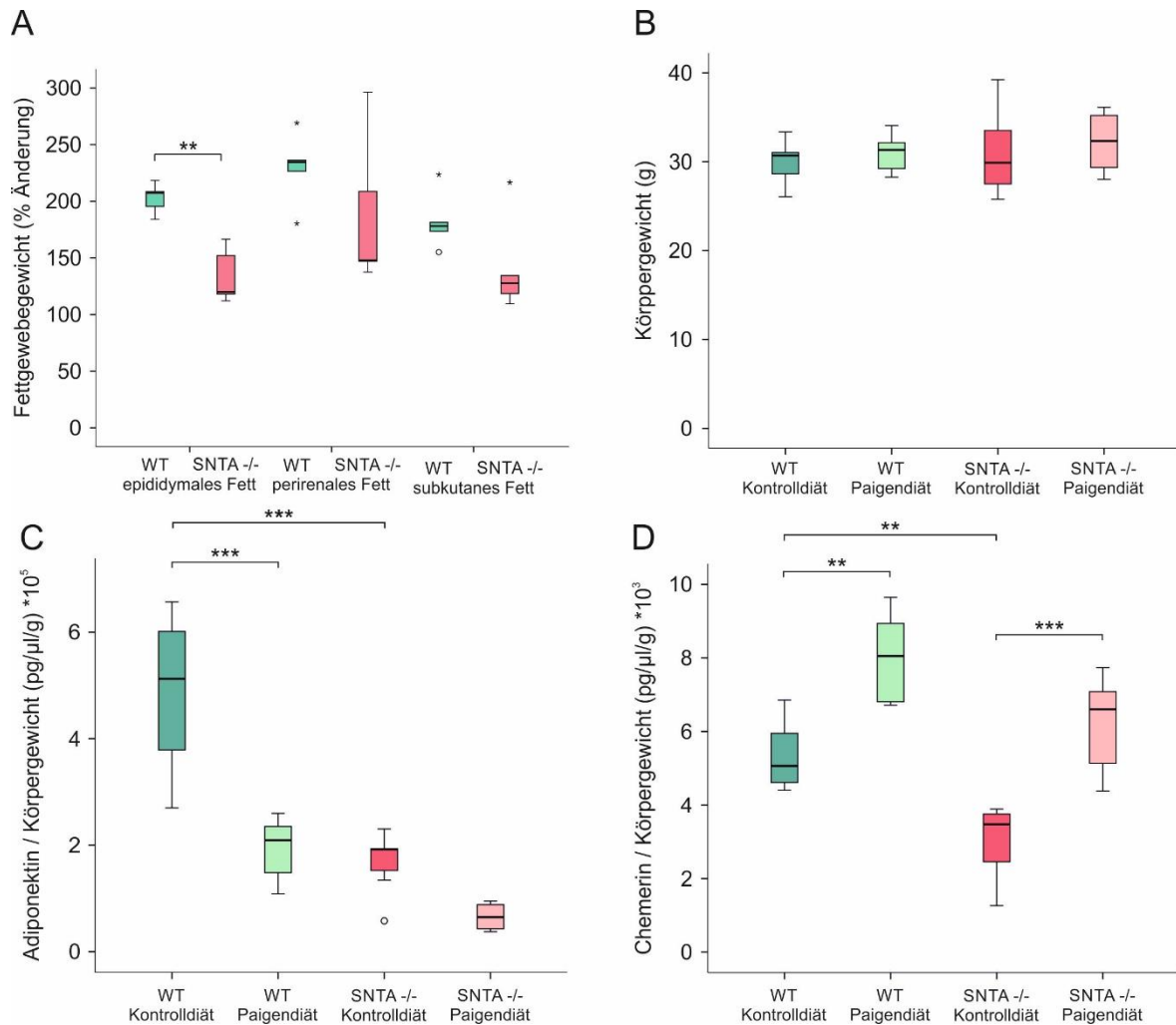


Abbildung 28: Fettgewebegewichte, Körpergewicht und Adipokine von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. A Fettgewebegewichtsveränderung des epididymalen, perirenales und subkutanen Fetts in Prozent. B Körpergewicht. C Adiponektin im Serum. D Chemerin im Serum. Die Normalisierung in A, C und D erfolgte auf das Körpergewicht. n = 6; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.2.1.3.2 Der Lipidmetabolismus wird durch den SNTA-Knockout nicht verändert

Eine vermehrte Lipidsynthese und -speicherung sind essentielle Merkmale der NAFLD. Im Folgenden wurden die hepatische Steatose, Proteine der Fettsäuresynthese und des Cholesterinmetabolismus analysiert.

3.2.1.3.2.1 Steatosegrad

Die Steatose wurde histologisch mittels einer H&E-Färbung untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die Lebern der Wildtyp-, als auch der SNTA -/- Mäuse nach einer zwölf-wöchigen Fütterung der Paigendiät stark verfettet waren (siehe Abbildung 29).

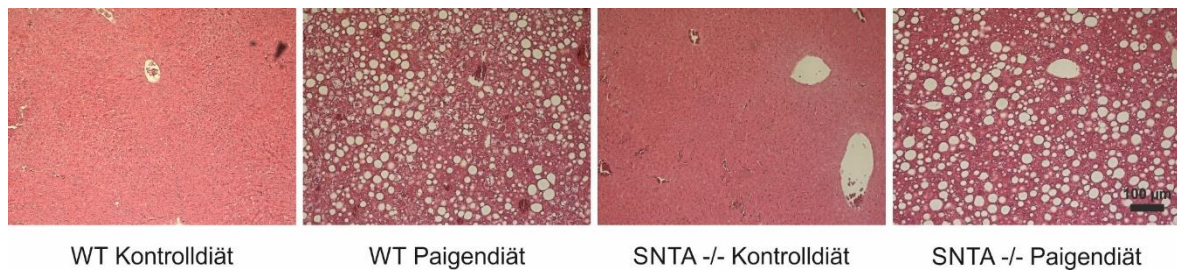


Abbildung 29: Lebersteatose von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. Hämalaun-Eosin-Färbung der Leber.

3.2.1.3.2.2 Fettsäuresynthese

Bei der Paigendiät werden Gene der Fettsäuresynthese hochreguliert [194].

Die proteinbiochemische Untersuchung von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen zeigte sowohl beim Wildtyp-, als auch beim Knockout-Modell eine erhöhte Expression, was auf eine vermehrte Fettsäuresynthese in den Lebern der mit Paigendiät gefütterten Tiere schließen lässt (siehe Abbildung 30 A). Sowohl SREBP1c, als auch SCD1 wurden durch die zwölf-wöchige Fütterung der Paigendiät in beiden Genotypen teilweise signifikant hochreguliert (siehe Abbildung 30 A - C). Lediglich die Expressionsanalyse von FAS lieferte keine signifikanten genotypspezifischen oder diätspezifischen Veränderungen (Abbildung 30 D).

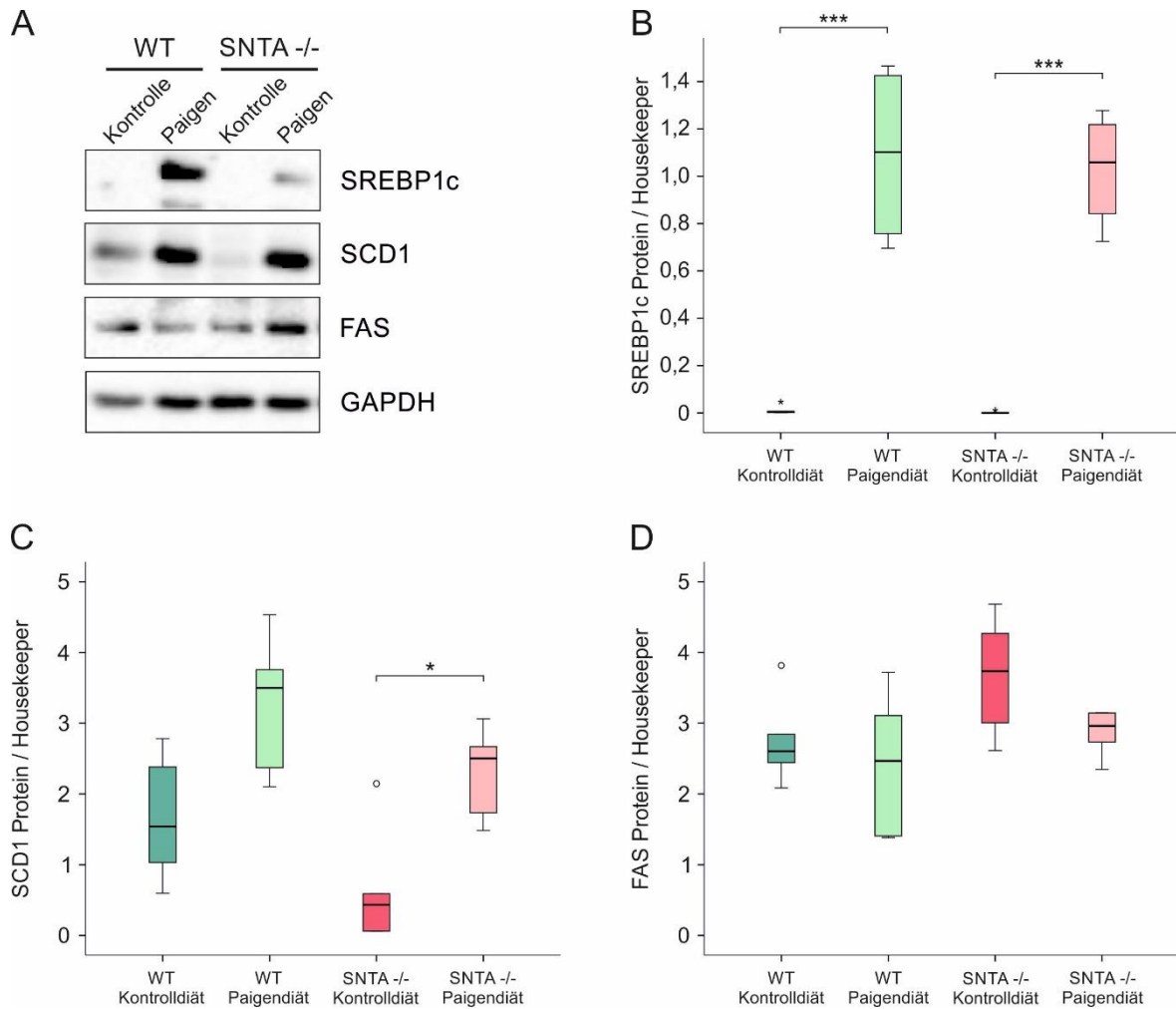


Abbildung 30: Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. A Exemplarischer Immunoblot der SREBP1c-, SCD1- und FAS-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der SREBP1c-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. C Quantifizierung der SCD1-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. D Quantifizierung der FAS-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. n = 6; * p < 0,05; *** p < 0,001.

3.2.1.3.2.3 Cholesterinmetabolismus

Mögliche Veränderungen des Cholesterinmetabolismus zwischen den Diäten oder den Genotypen wurden mittels dreier verschiedener, in diesem Stoffwechsel wichtiger Moleküle, analysiert: ERK1/2, SR-BI und Caveolin-1.

Dabei zeigte sich in der Quantifizierung der Protein-Expression des durch Phosphorylierung aktivierten ERK1/2 und SR-BI weder zwischen den Diäten noch zwischen den Genotypen ein Unterschied (siehe Abbildung 31 A - C). Dagegen war das Caveolin-1-Proteinlevel sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTA -/- Mäusen in

ähnlichem Maße bei Fütterung der Paigendiät im Vergleich zur Kontrolldiät höchst signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt (siehe Abbildung 31 A, D).

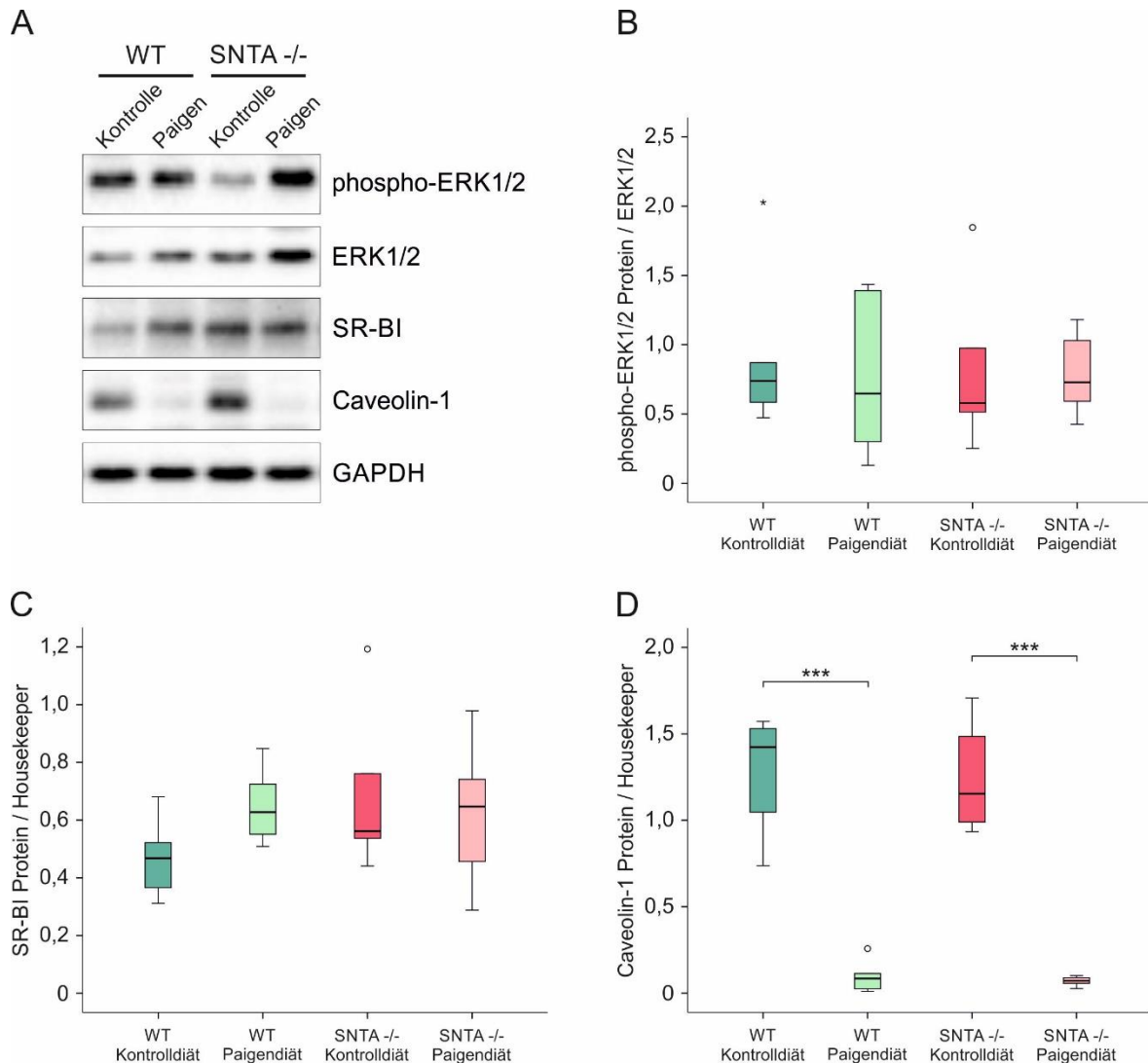


Abbildung 31: Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. A Exemplarischer Immunoblot der ERK1/2-, phospho-ERK1/2-, SR-BI- und Caveolin-1-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der phospho-ERK1/2-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. Die Normalisierung erfolgte auf die ERK1/2-Protein-Expression. C Quantifizierung der SR-BI-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. D Quantifizierung der Caveolin-1-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. $n = 6$, *** $p < 0,001$.

3.2.1.3.3 Die Entzündung wird durch den SNTA-Knockout nicht verändert

Durch die Fütterung einer atherogenen Paigendiät entwickelt sich innerhalb von vier bis zwölf Wochen eine NASH, welche mit Entzündung einhergeht [195]. In diesem Mausmodell wurde die Entzündung mit Hilfe der Analyse der mRNA-Expression von Makrophagenmarkern und T-Zell-Markern untersucht.

Die Entzündungsmarker F4/80 und CD68 waren sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTA $-/-$ Tieren auf Paigendiät gleichermaßen höchst ($p < 0,001$) bzw. hoch ($p = 0,001$ bzw. $0,002$) signifikant erhöht (siehe Abbildung 32 A, B). Der Rezeptor CD4 als Marker für T-Helferzellen lag lediglich bei den Wildtyp-Mäusen auf Paigendiät im Vergleich zur Kontrolldiät signifikant ($p = 0,017$) erhöht vor (siehe Abbildung 32 C). Auch CD8 als Marker der zytotoxischen T-Zellen war nur bei den Wildtyp-Tieren auf Paigendiät im Vergleich zur Kontrolldiät höchst ($p < 0,001$) signifikant höher. Das Expressionslevel von CD8 in den SNTA $-/-$ Tieren war sowohl auf Kontrolldiät, als auch auf Paigendiät gegenüber den Wildtyp-Tieren signifikant ($p = 0,033$) bzw. höchst ($p < 0,001$) signifikant niedriger (siehe Abbildung 32 D).

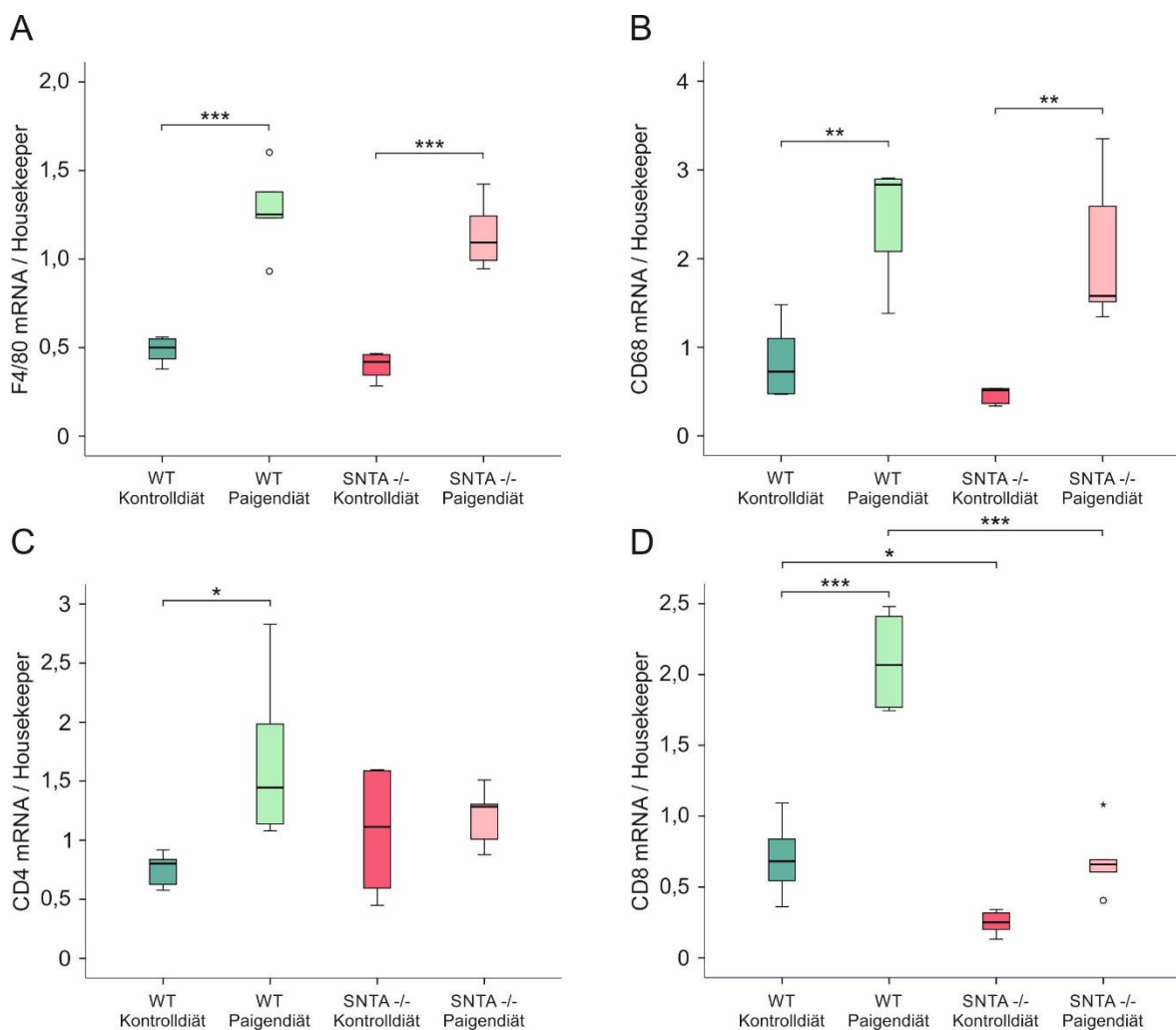


Abbildung 32: Hepatische Expression von Makrophagen- und Lymphozytengenen in Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. A F4/80-mRNA-Expression. B CD68-mRNA-Expression. C CD4-mRNA-Expression. D CD8-mRNA-Expression. $n = 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.1.3.4 Die Fibrose wird durch den SNTA-Knockout nicht verändert

Zusätzlich zur Entzündung entwickelt sich bei einer Paigendiät auch eine Fibrose [194]. Die Expression des Markers (α SMA) für aktivierte Sternzellen, welche Collagen in das Lebergewebe einlagern, war sowohl bei den Wildtyp- ($p = 0,016$), als auch bei den SNTA $-/-$ Mäusen ($p = 0,031$) signifikant erhöht (siehe Abbildung 33 A). Histologisch wurde die Leberfibrose mittels einer Sirius-Red-Färbung bestätigt. Beide Genotypen zeigten dabei einen ähnlichen Fibrosegrad (siehe Abbildung 33 B).

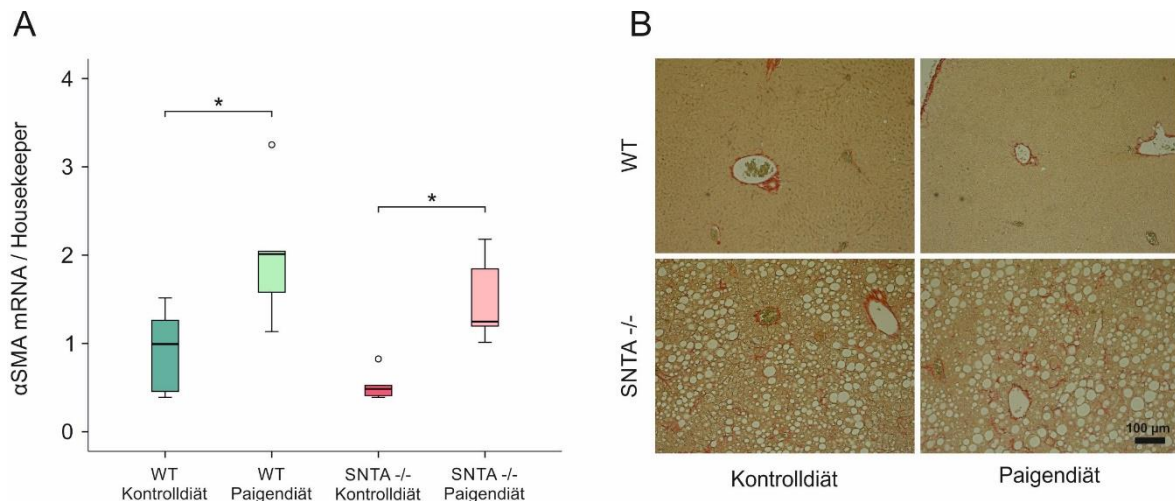


Abbildung 33: Hepatische Fibrose von Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. A α SMA-mRNA-Expression. B Sirius-Red-Färbung der Leber. $n = 6$; * $p < 0,05$.

3.2.1.3.5 Der oxidative Stress wird durch den SNTA-Knockout reduziert

Die atherogene Paigendiät induziert oxidativen Stress [155], welcher die Genese als auch die Progression der NAFLD begünstigt. Die Lipidperoxidation war ausschließlich bei den Wildtyp-Mäusen auf Paigendiät hoch signifikant ($p = 0,009$) angestiegen. Bei den Knockout-Tieren zeigte sich dagegen im Vergleich der beiden Diäten kein Unterschied im oxidativen Stress ($p = 1$). Auf Paigendiät war daher der Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen hoch signifikant ($p = 0,003$) (siehe Abbildung 34).

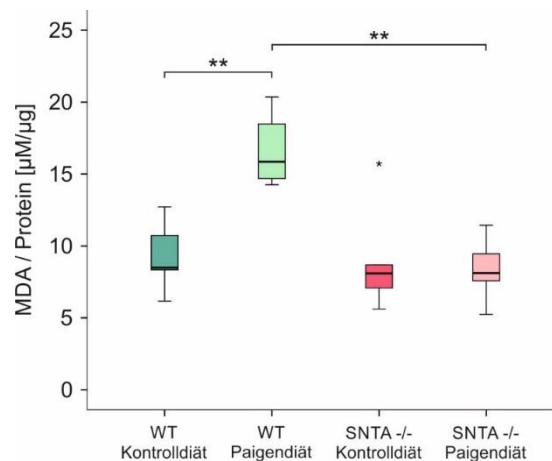


Abbildung 34: Hepatischer Oxidativer Stress von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölfwöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. Malondialdehyd (MDA)-Konzentration. Die Normalisierung erfolgte auf das Gesamtprotein der Leberlysate. n = 6; ** p < 0,01.

3.2.1 SNTA in der murinen Fettleber

Zur Analyse der Rolle von SNTA in der NAFLD wurde als weiteres Modell die Verfütterung einer fettreichen Diät verwendet. Dazu wurden SNTA -/- sowie Wildtyp-Mäuse auf eine reichhaltige Hochfettdiät und die entsprechende Standarddiät gesetzt.

3.2.1.3 Die Insulin Response wird durch den SNTA-Knockout verbessert

Übergewicht bzw. Adipositas sind Risikofaktoren für die Entstehung einer Insulinresistenz. Um die Insulin-Signaltransduktion im Tiermodell zu untersuchen, wurde den Mäusen vor der Präparation Insulin intraperitoneal gespritzt (siehe 2.2.2.3.3). Der Insulinsignalweg konnte daraufhin mit Hilfe von Expressionsanalysen der AKT überprüft werden. AKT stellt ein zentrales Molekül in der Insulinrezeptor vermittelten Signaltransduktion dar, welches durch Phosphorylierung aktiviert wird und u.a. die Glukoseaufnahme der Zellen steigert [196, 197].

Die AKT-Aktivierung wurde in der Leber, dem subkutanem Fett und den beiden intraabdominellen Fettgeweben (epididymal und perirenal) untersucht.

In den Leber der Wildtyp-, als auch der SNTA -/- Mäuse bewirkte Insulin die Phosphorylierung und somit die Aktivierung der AKT. Bei den Wildtyp-Tieren auf Hochfettdiät ist diese Aktivierung, wie bei einer Adipositas zu erwarten ist, gestört. Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung der AKT bei den SNTA -/- Mäusen durch die Hochfettdiät nicht beeinflusst (siehe Abbildung 35 A, B). Im subkutanen Fettgewebe der

mit der Standarddiät gefütterten Mäuse wurde die AKT bei Insulin-Injektion phosphoryliert. Dies war jedoch nur bei den mutierten Tieren signifikant. Bei den mit der Hochfettdiät gefütterten Mäusen konnte die AKT-Phosphorylierung vor allem bei den SNTA $-/-$ Tieren beobachtet werden; der Effekt war jedoch nicht signifikant ($p = 0,176$) (siehe Abbildung 35 C, D).

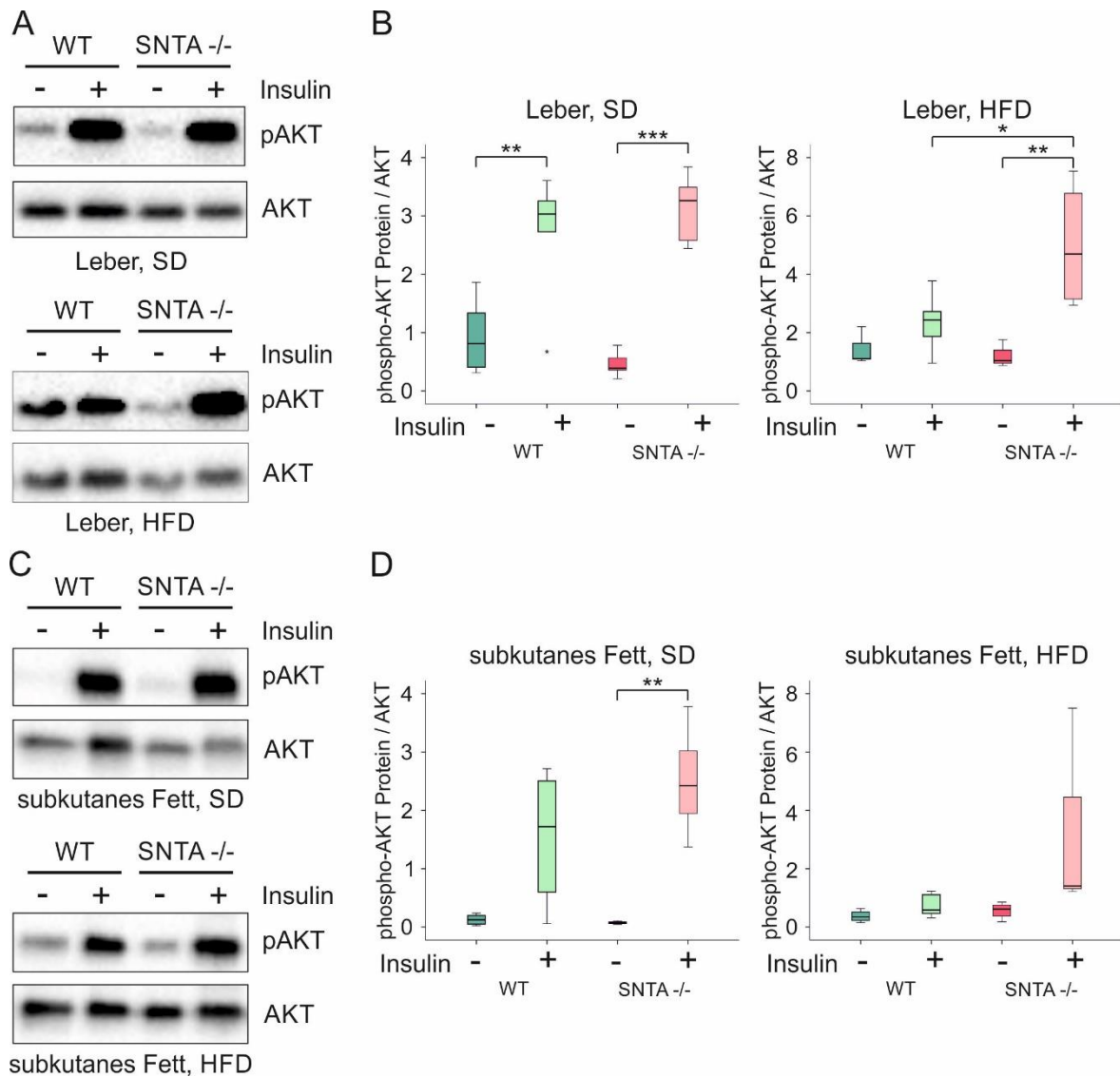


Abbildung 35: Insulin Response in der Leber und dem subkutanen Fett von Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- und der Hochfettdiät. A Exemplarischer Immunoblot der phospho-AKT (pAKT)-Protein-Expression in der Leber der Mäuse mit und ohne Insulin-Injektion. Die AKT-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der pAKT-Protein-Expression von A durch densitometrische Vermessung. Die Normalisierung erfolgte auf die AKT-Protein-Expression. C Exemplarischer Immunoblot der pAKT-Protein-Expression im subkutanen Fettgewebe der Mäuse mit und ohne Insulin-Injektion. Die AKT-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. D Quantifizierung der pAKT-Protein-Expression in C durch densitometrische Vermessung. Die Normalisierung erfolgte auf die AKT-Protein-Expression. $n = 6$; * $p < 0,05$.

Im epididymalen Fettgewebe zeigte sich auf Standarddiät und Hochfettdiät eine ähnliche Aktivität des Insulinsignalwegs für beide Genotypen. Durch die Insulin-Injektion stieg die Phosphorylierung von AKT hoch bzw. höchst signifikant an (siehe Abbildung 36 A, B). Im Gegensatz dazu ließ sich im perirenenalen Fettgewebe ausschließlich bei den SNTA $-/-$ Tieren eine höchst bzw. hoch signifikante Aktivierung von AKT durch die Insulin-Injektion bei beiden Diäten detektieren (siehe Abbildung 36 C, D).

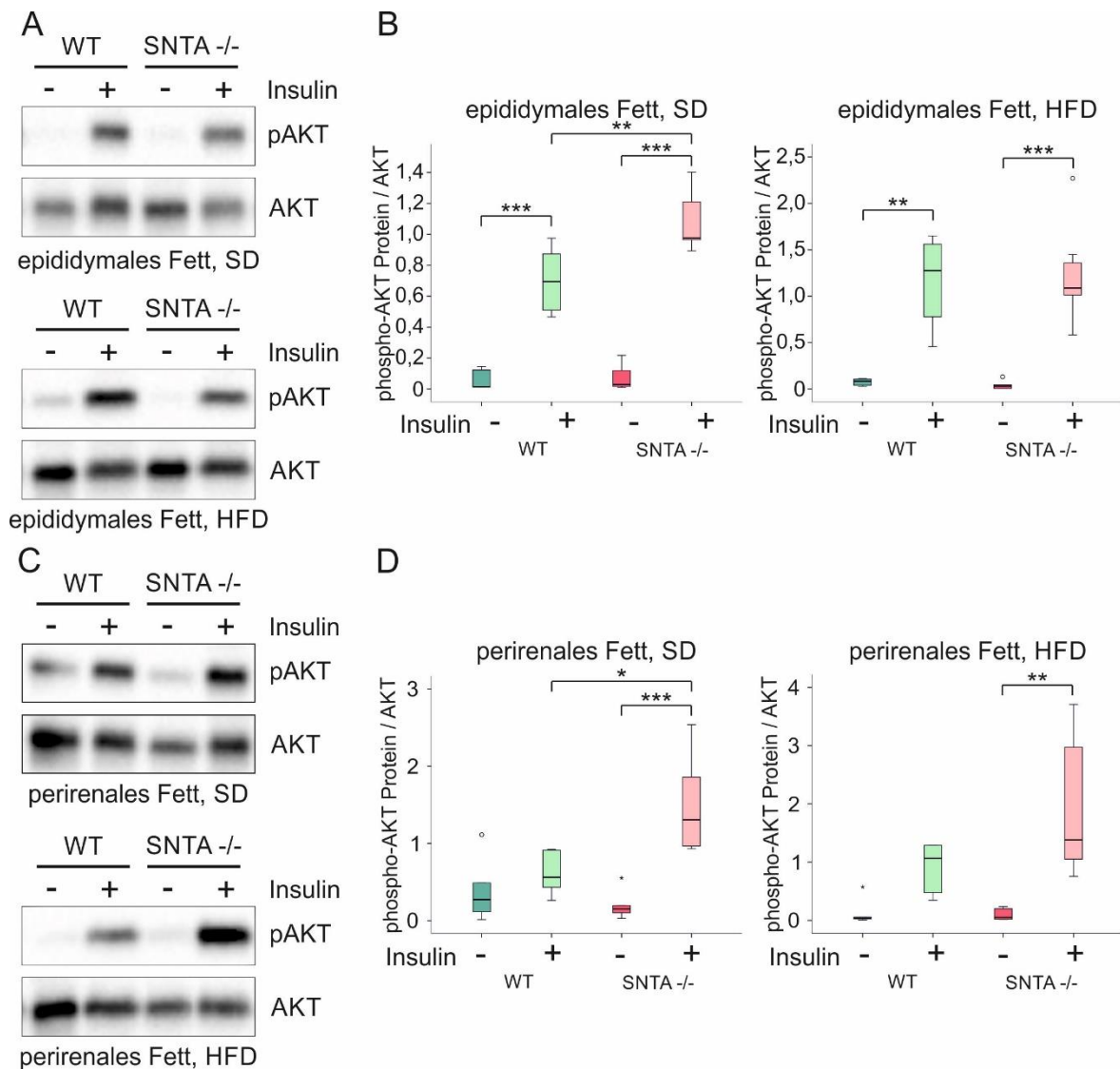


Abbildung 36: Insulin Response in dem epididymalen und dem perirenenalen Fett von Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- und der Hochfettdiät. A Exemplarischer Immunoblot der phospho-AKT (pAKT)-Protein-Expression im epididymalen Fettgewebe der Mäuse mit und ohne Insulin-Injektion. Die AKT-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der phospho-AKT-Protein-Expression in A durch densitometrische Vermessung. Die Normalisierung erfolgte auf die AKT-Protein-Expression. C Exemplarischer Immunoblot der pAKT-Protein-Expression im perirenenalen Fettgewebe der Mäuse mit und ohne Insulin-Injektion. Die AKT-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. D Quantifizierung der phospho-AKT-Protein-Expression in C durch densitometrische Vermessung. Die Normalisierung erfolgte auf die AKT-Protein-Expression. n = 6; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.2.1.4 Differenziell exprimierte Gene in der Leber der SNTA-Knockout-Tiere

Um die Rolle der Syntrophine in der Leber weiter abzuklären, wurde eine DNA-Microarray Hybridisierung im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik beauftragt. Es wurde die Genexpression in den Lebern von Wildtyp- und SNTA $-/-$ Mäusen auf Hochfettdiät durchgeführt. Die hierbei identifizierten, differentiell exprimierten Gene wurden daraufhin mittels der semiquantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion in RNA-Proben isoliert aus den Lebern von Tieren ernährt mit der Hochfettdiät, der MCD-Diät, der Paigendiät und *in vitro* untersucht bzw. verifiziert.

3.2.2.4.1 Verifizierung der differenziell exprimierten Gene im Hochfettdiät-Modell

Die Gene CIDEA (*cell death-inducing DFFA-like effector a*) und CIDEc (*cell death-inducing DFFA-like effector c*) spielen eine Rolle im Lipidmetabolismus, sind in der Fettleber erhöht und fördern die Steatose [198-200]. Die Expression beider Gene war in den Lebern der Knockout-Tiere auf Hochfettdiät im Vergleich zum Wildtyp höchst ($p < 0,001$) bzw. hoch ($p = 0,004$) signifikant erniedrigt. Die Expression lag bei den Wildtyp-Mäusen auf Hochfettdiät im Vergleich zur Standarddiät bei CIDEA höchst signifikant ($p < 0,001$) und bei CIDEc nicht ($p = 0,849$) erhöht vor. Bei den SNTA $-/-$ Mäusen dagegen zeigten sich keine diätspezifischen Expressionsunterschiede (siehe Abbildung 37 A, B).

Ein weiteres differenziell exprimiertes Gen ist der Immunzellrezeptor CLEC2H (*c-type lectin domain family 2h*), welcher am zellulären Abwehrmechanismus beteiligt ist [201]. Es wurde ein signifikanter ($p = 0,046$) Expressionsunterschied zwischen den Wildtyp- und den SNTA $-/-$ Mäusen auf Hochfettdiät verzeichnet, wobei das Gen in den mutierten Mäusen erniedrigt vorlag (siehe Abbildung 37 C).

COL1A1 (*collagen 1a1*) ist Bestandteil des Kollagen 1 und fungiert daher als Fibrosemarker. Bei den Wildtyp-Tieren ließ sich im Gegensatz zu den SNTA $-/-$ Mäusen eine höchst signifikante ($p < 0,001$) Hochregulation von COL1A1 bei der Hochfettdiät im Vergleich zur Standarddiät feststellen. Der Unterschied zwischen den beiden Genotypen auf Hochfettdiät war ebenfalls höchst signifikant ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 37 D).

Das in seiner genaueren Funktion weitreichend unbekannte Gen CYP4A12A (*cytochrome 4a12a*) ist am Lipidmetabolismus beteiligt [202]. Bei den Wildtyp-Tieren zeigte sich eine hoch signifikante ($p = 0,001$) Reduktion auf Hochfettdiät im Vergleich zur Standarddiät. Dagegen war das Expressionslevel bei den SNTA $-/-$ Mäusen zwischen den Diäten

ähnlich ($p = 1$). Im Vergleich der Genotypen ließ sich ein hoch signifikanter ($p = 0,001$) Unterschied bei der Hochfettdiät verzeichnen. Die Wildtyp-Tiere wiesen dabei eine niedrigere Expression auf (siehe Abbildung 37 E).

Das Mitglied der *3 β -hydroxysteroid dehydrogenase* (3 β -HSD)-Familie HSD3B5 (*hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase*) ist nicht wie andere Isoformen an der Biosynthese von Steroidhormonen beteiligt, sondern katalysiert deren Inaktivierung [203]. Die Expression war bei den Knockout-Tieren auf Hochfettdiät gegenüber der Standarddiät und ebenso gegenüber den Wildtyp-Tieren auf Hochfettdiät gleichermaßen hoch signifikant ($p = 0,002$) erhöht (siehe Abbildung 37 F).

Das bei hepatischer Inflammation synthetisierte und sezernierte SAA2 (*serum amyloid a2*) [204] zeigte eine signifikant ($p = 0,021$) erhöhte Expression ausschließlich bei den Wildtyp-Mäusen auf Hochfettdiät. Bei den SNTA-defizienten Tieren lag kein diätspezifischer Unterschied vor. Der Expressionsunterschied zwischen den beiden Genotypen auf Hochfettdiät wurde als signifikant ($p = 0,044$) berechnet (siehe Abbildung 37 G).

SLC15A5 (*solute carrier 15a5*) ist ein Mitglied der Proton-gekoppelten Oligopeptid-Transporter-Familie SLC15. Es ist beteiligt am Peptidtransport mit aber noch weitreichend unbekannter Funktion [205]. Die mRNA-Expression war zwischen den Diäten bei beiden Genotypen unverändert. Der Expressionsunterschied zwischen den Genotypen dagegen war bei beiden Diäten gleichermaßen höchst signifikant ($p < 0,001$). Dabei war die Expression von SLC15A5 in den Lebern der SNTA $-/-$ Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren stark erniedrigt (siehe Abbildung 37 H).

Als ein weiteres durch den SNTA-Knockout differenziell exprimiertes Gen wurde TUBA8 (*tubulin alpha 8*) identifiziert. Dieses Protein wurde näher untersucht, da es wie SNTA eine Rolle im Zytoskelett ausübt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

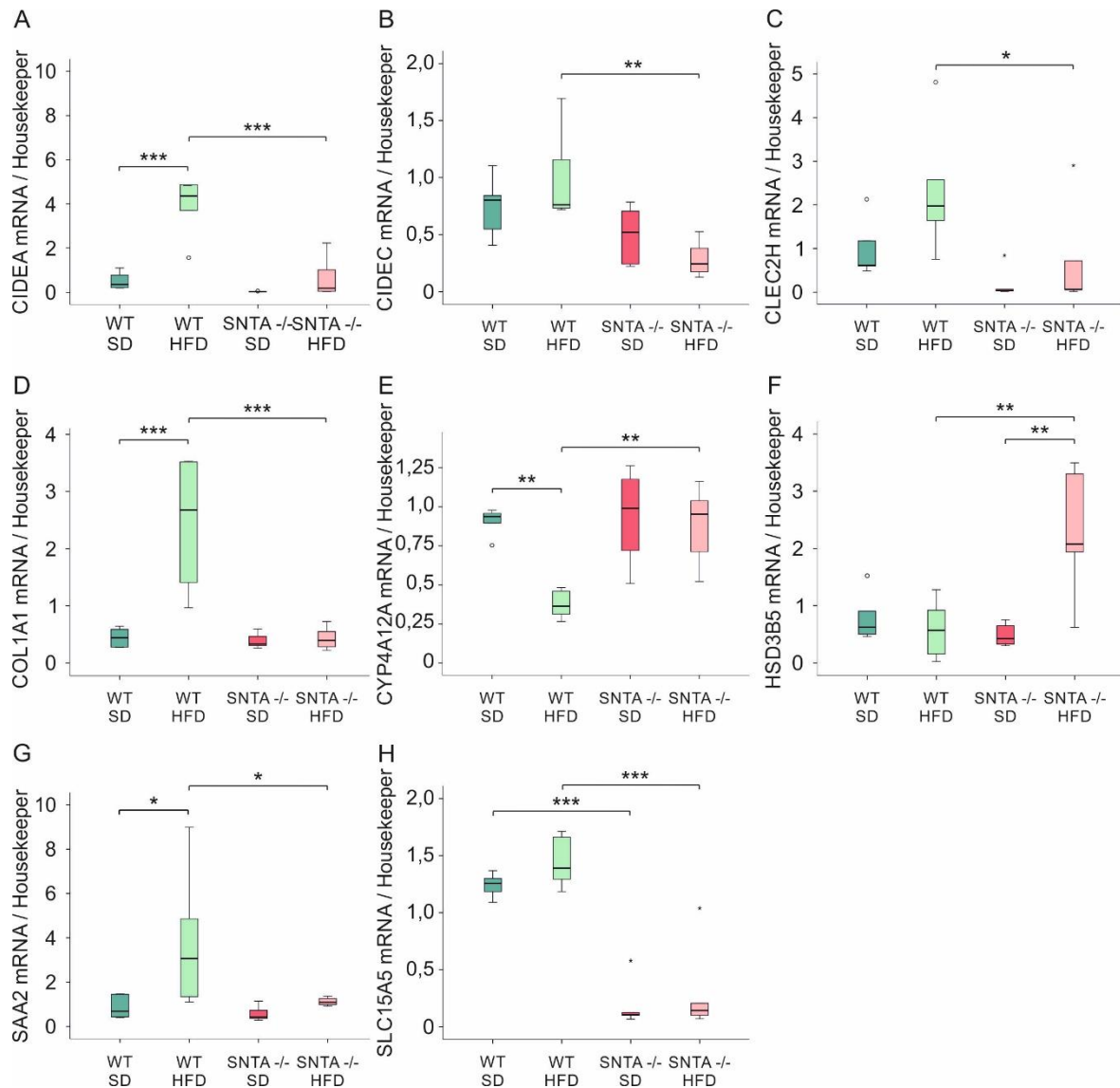


Abbildung 37: Differenziell exprimierte Gene von Wildtyp (WT)- und SNTA^{-/-} Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- und der Hochfettdiät in der Leber. A CIDEA-mRNA-Expression. B CIDEC-mRNA-Expression. C CLEC2H-mRNA-Expression. D COL1A1-mRNA-Expression. E CYP4A12A-mRNA-Expression. F HSD3B5-mRNA-Expression. G SAA2-mRNA-Expression. H SLC15A5-mRNA-Expression. n = 6; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.2.2.4.2 Analyse der differenziell exprimierten Gene im MCD-Diätmodell

Die im Kapitel 3.2.2.4.1 beschriebenen Gene wurden auch in den Lebern der Mäuse, die mit der MCD- bzw. MCDK-Diät gefüttert wurden, untersucht.

CIDEC ist in der NASH-Leber erhöht exprimiert [206] und ein höchst signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg zeigte sich auch in den hier untersuchten Wildtyp-Tieren. Bei den Knockout-Tieren war, im Vergleich zum Wildtyp auf MCD-Diät, CIDEC hoch signifikant ($p = 0,005$) erniedrigt. (siehe Abbildung 38 A). Die Expressionslevel von CLEC2H zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Die Expression war

lediglich bei den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät im Vergleich zur MCDK-Diät signifikant ($p = 0,024$) erniedrigt (siehe Abbildung 38 B). Bei SLC15A5 konnte auf MCDK-Diät eine höchst signifikante ($p < 0,001$) Reduktion bei den Knockout-Mäusen gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Zusätzlich ließ sich diätspezifisch bei den Wildtyp- und auch bei den SNTA $-/-$ Mäusen eine höchst signifikante ($p < 0,001$) bzw. signifikante ($p = 0,021$) Erniedrigung in der NASH-Leber verzeichnen (siehe Abbildung 38 C).

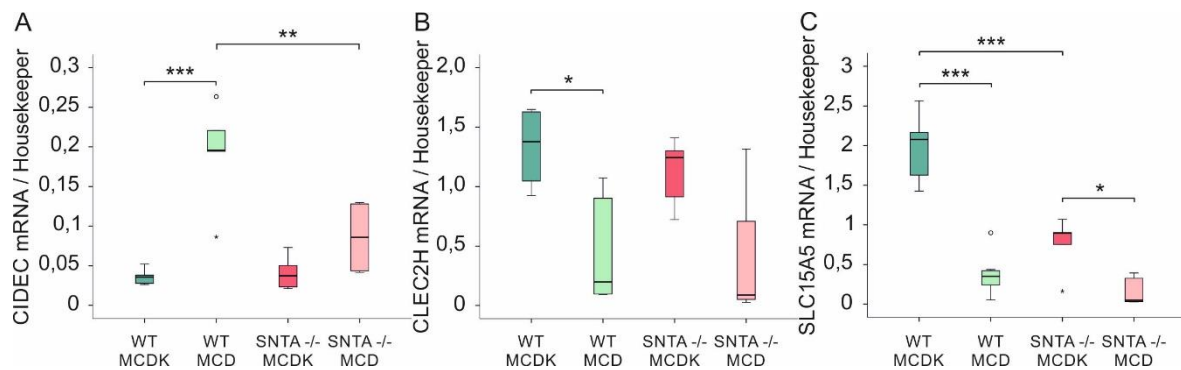


Abbildung 38: Differenziell exprimierte Gene in der Leber von Wildtyp (WT)- und SNTA $-/-$ Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A CIDEc-mRNA-Expression. B CLEC2H-mRNA-Expression. C SLC15A5-mRNA-Expression. $n = 5 - 6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.2.4.3 Analyse der differenziell exprimierten Gene im Paigendiät-Modell

Die oben beschriebenen differenziell exprimierten Gene wurden auch in den Lebern der Mäuse, die mit der Paigendiät gefüttert wurden, untersucht.

CIDEc zeigte keinen genotypspezifischen Unterschied in der Expression. Es wurde jedoch in den Lebern der mit Paigendiät ernährten Tiere stark reprimiert. Die Expression lag dabei bei der Paigendiät im Wildtyp höchst ($p < 0,001$) bzw. im Knockout hoch ($p = 0,001$) signifikant erniedrigt vor (siehe Abbildung 39 A). Der Expressionsunterschied von CLEC2H zwischen den beiden Genotypen war auf Paigendiät höchst signifikant ($p < 0,001$). Die Knockout-Mäuse wiesen dabei eine erniedrigte Expression auf. Im Vergleich zwischen den Diäten zeigte sich lediglich bei den Wildtyp-Mäusen eine höchst signifikante ($p < 0,001$) Erhöhung (siehe Abbildung 39 B). SLC15A5 wies keine differenzielle Expression beim Vergleich zwischen den Diäten auf. Die Expression war aber bei den SNTA $-/-$ im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren sowohl bei der Kontrolldiät ($p = 0,001$), als auch bei der Paigendiät ($p = 0,006$) hoch signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 39 C).

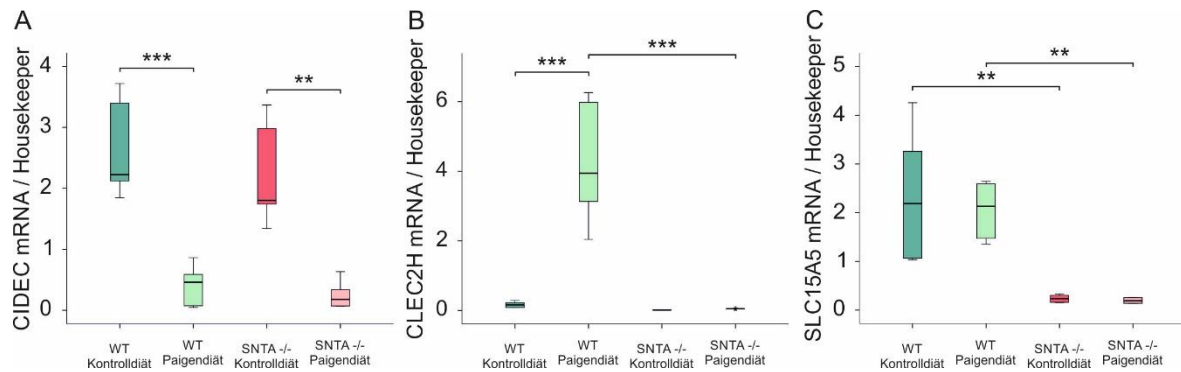


Abbildung 39: Differenziell exprimierte Gene in den Lebern von Wildtyp (WT)- und SNTA^{-/-} Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. A CIDEc-mRNA-Expression. B CLEC2H-mRNA-Expression. C SLC15A5-mRNA-Expression. n = 6; ** p < 0,01; * p < 0,001.**

3.2.2.4.4 Analyse der differenziell exprimierten Gene nach SNTA-Knockdown

Um zu überprüfen, ob der Effekt der in den Lebern der SNTA-Knockout-Tiere differenziell exprimierten Gene direkt durch das Fehlen von SNTA in den parenchymalen Zellen zu erklären ist, wurden *in vitro* Versuche durchgeführt. Dazu wurde in einer murinen Hepatozyten-Zelllinie (Hepa1-6) die SNTA-Expression mittels siRNA herunterreguliert und die Expression der *in vivo* differenziell exprimierten Gene analysiert.

Abbildung 40 A zeigt, dass der SNTA-Knockdown funktionierte. Die Expression von SNTA konnte durch die siRNA Transfektion höchst signifikant ($p < 0,001$) vermindert werden. Daraufhin wurde in diesen Zellen die Expression von CIDEc analysiert. Das CIDEc-Expressionslevel war bei den Zellen mit dem SNTA-Knockdown höchst signifikant ($p < 0,001$) herunterreguliert (siehe Abbildung 40 B). Die Expression von CLEC2H und SLC15A5 konnte mittels der semiquantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion nicht ermittelt werden.

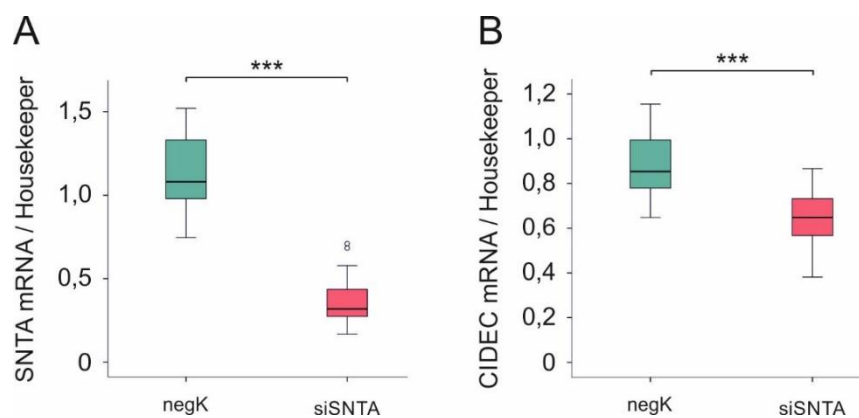


Abbildung 40: Differenziell exprimierte Gene in mit SNTA siRNA behandelten Hepa1-6 Zellen. A SNTA-mRNA-Expression. B CIDEc-mRNA-Expression. n = 9; * p < 0,001.**

3.3 TUBA8 in der murinen Leber

Ein weiteres, durch den SNTA-Knockout, differenziell exprimiertes Gen war TUBA8. Hier handelt es sich um ein Mitglied der Tubulin-Familie mit noch weitgehend unbekannter Funktion. Die α -Tubuline bilden zusammen mit den β -Tubulinen spiralförmig abwechselnd angeordnet einen Hohlzylinder, den Mikrotubulus. Dieser bildet zusammen mit den Aktinfilamenten und den Intermediärfilamenten das Zytoskelett, welches für die Form und Stabilität der Zelle sowie den Transport innerhalb der Zelle sorgt. Erste Forschungen zeigen, dass TUBA8-Aminosäuren, die für die Tubulin-Interaktion wichtig sind, fehlen [207]. Ob und wie TUBA8 an der Bildung oder der Funktion des Zytoskeletts beteiligt ist bleibt daher unklar. Erste Ergebnisse von Kamino *et al.* weisen auf eine Rolle von TUBA8 in der Zellproliferation bzw. Migration in hepatozellulären Zelllinien hin. Die Effekte der TUBA8 Überexpression variieren jedoch je nach verwendeter Zelllinie [208]. Des Weiteren wurde eine ca. 100-fach erhöhte TUBA8-Expression in den durch Phenobarbitalbehandlung induzierten murinen Lebertumoren nachgewiesen [208]. In dieser Arbeit wurde aufgrund der differenziellen Expression in den Lebern der SNTA -/- Mäuse TUBA8 weiter untersucht.

3.3.1 Die TUBA8-Expression in murinen Geweben

In der Literatur wurde bereits eine mäßige TUBA8-Expression in der gesunden Leber beschrieben [207, 208]. In dieser Arbeit wurde die TUBA8-Expression in weiteren für den Glukose- und Lipidmetabolismus wichtigen Geweben ermittelt. Dazu zählt neben der Leber das weiße Fettgewebe, das braune Fettgewebe und der Skelettmuskel.

Die Geweboblots von drei verschiedenen Wildtyp-Mäusen zeigten eine ähnliche Expression von TUBA8 in der Leber und den drei untersuchten weißen Fettgeweben - dem subkutanen weißen Fettgewebe und den beiden intraabdominellen weißen epididymalen und perirenal Fettgeweben. Das TUBA8-Protein in der Milz war um das 4-fache und im Skelettmuskel und dem braunen Fettgewebe um das 16-fache im Vergleich zur Leber erhöht (Abbildung 41 A, B).

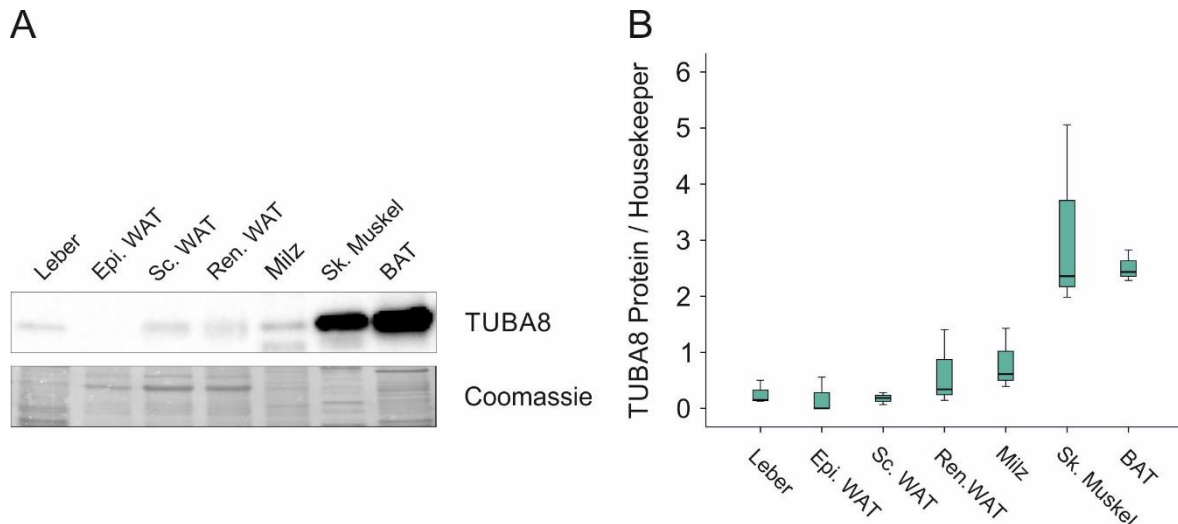


Abbildung 41: TUBA8-Expression in verschiedenen murinen Geweben. A Exemplarischer Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression in der Leber, dem epididymalen (Epi), dem subkutanen (Sc) und dem perirenal (Ren) weißen Fettgewebe (WAT), der Milz, dem Skelettmuskel und dem braunen Fettgewebe (BAT). Die Coomassie gefärbte Membran diente als Ladekontrollen. B Quantifizierung der TUBA8-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. n = 3.

3.3.2 Expression und Lokalisation von TUBA8 in der humanen und murinen Leber

Des Weiteren wurde die Expression und die Lokalisation von TUBA8 in der Leber untersucht. Die Leber besteht zu 80 % aus Hepatozyten. Die restlichen 20 % sind nicht-parenchymale Zellen wie Kupffer-Zellen (Makrophagen), Sternzellen und Endothelzellen.

Durch Western Blot Analysen mit Lysaten von primären humanen Sternzellen und primären humanen Hepatozyten von drei verschiedenen Spendern wurde eine starke Expression von TUBA8 in den Sternzellen und keine Expression in den Hepatozyten festgestellt. Auch nach längerer Expositionszeit konnte keine Expression in den primären Hepatozyten detektiert werden (siehe Abbildung 42 A). Dagegen konnte in verschiedenen humanen hepatischen Zelllinien (PLC, Hep3B, HepG2 und Huh7) eine TUBA8-Protein-Expression festgestellt werden (siehe Abbildung 42 B). Ein Vergleich der TUBA8-Expression in primären humanen Sternzellen und der Sternzelllinie LX-2, sowie der Makrophagenzelllinie RAW 264.7 und der Hepatozytenzelllinie HepG2 zeigte eine stärkere Expression in den Zelllinien (siehe Abbildung 42 C).

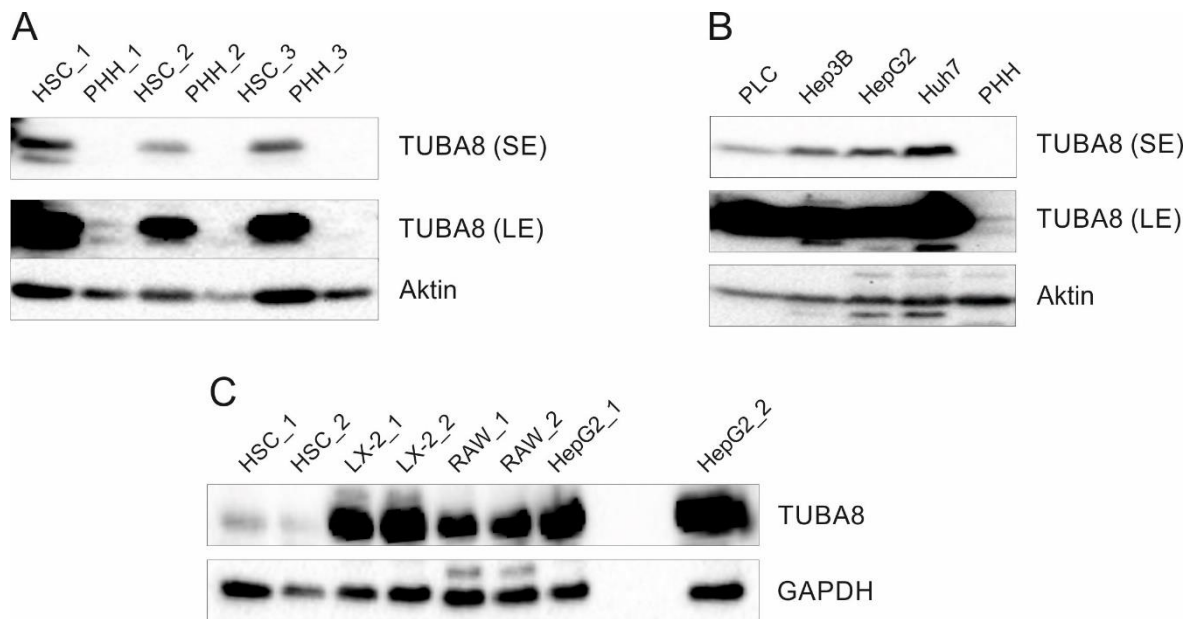


Abbildung 42: Expression von TUBA8 in verschiedenen primären Zellen und Zelllinien. A Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression in primären humanen hepatischen Sternzellen (HSC) und primären humanen Hepatozyten (PHH) von jeweils drei Spendern (1 – 3). SE (*short exposure*) gibt eine kurze Belichtungszeit, LE (*long exposure*) eine lange Belichtungszeit der Immunoblots an. Die Aktin-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression in den Zelllinien PLC, Hep3B, HepG2 und Huh7 und den primären humanen Hepatozyten. SE (*short exposure*) gibt eine kurze Belichtungszeit, LE (*long exposure*) eine lange Belichtungszeit der Immunoblots an. Die Aktin-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. C Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression in primären humanen hepatischen Sternzellen und den Zelllinien LX-2, RAW264.7 und HepG2 von jeweils zwei verschiedenen Spendern bzw. Zelllysaten. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle.

Da TUBA8 stark in den primären Sternzellen exprimiert wird, wurde die Lokalisation von TUBA8 mittels immunhistochemischer und Immunfluoreszenzfärbung verifiziert. Dazu wurden murine Leberschnitte von Wildtyp-Mäusen immunhistochemisch mit TUBA8-Antikörpern gefärbt. Es zeigte sich eine Lokalisation von TUBA8 in Gallengangszellen und Sternzellen (siehe Abbildung 43 A). Um dies zu betätigen, wurde zusätzlich eine Koimmunfluoreszenzfärbung mit TUBA8 und Desmin, einem Sternzellmarker, durchgeführt. Die Kolokalisation zwischen TUBA8 und Desmin bestätigte die Expression und Lokalisation von TUBA8 in den Sternzellen (siehe Abbildung 43 B).

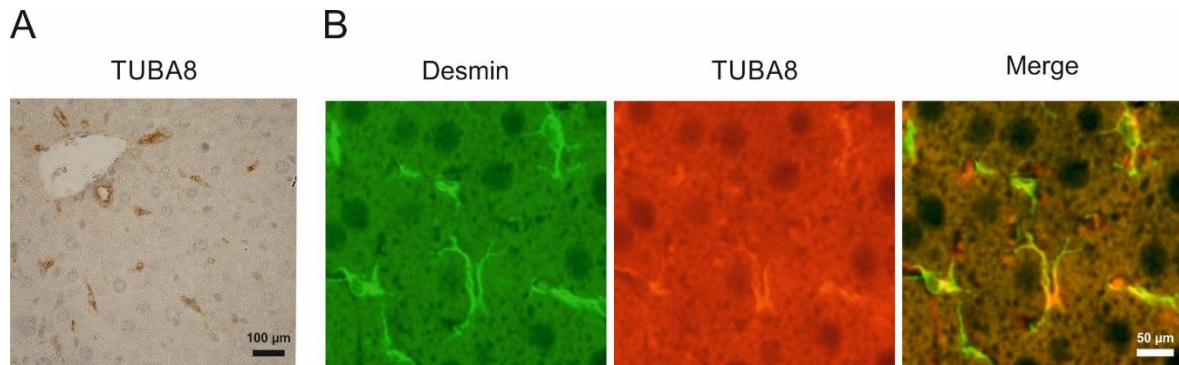


Abbildung 43: Zelluläre Lokalisation von TUBA8 in der murinen Leber. A Immunhistochemische Färbung von TUBA8. B Immunfluoreszente Doppelfärbung von Desmin und TUBA8.

3.3.3 TUBA8 im humanen HCC

Die TUBA8-Expression ist im murinen HCC um das 100-fache erhöht [208]. Die Analyse von humanen Proben im Vergleich von Tumorgewebe und Nicht-Tumorgewebe von 18 Spendern zeigte eine signifikant erhöhte TUBA8-Protein-Expression im Tumor (siehe Abbildung 44 A, B). Zu Diagnosezwecken kann TUBA8 nicht verwendet werden, da zwischen der Expression und dem Staging oder Grading des HCCs keine signifikanten Assoziationen vorhanden waren (siehe Abbildung 44 C, D). Eine Korrelation zwischen TUBA8 und α SMA im Tumorgewebe war nicht gegeben (siehe Abbildung 44 E).

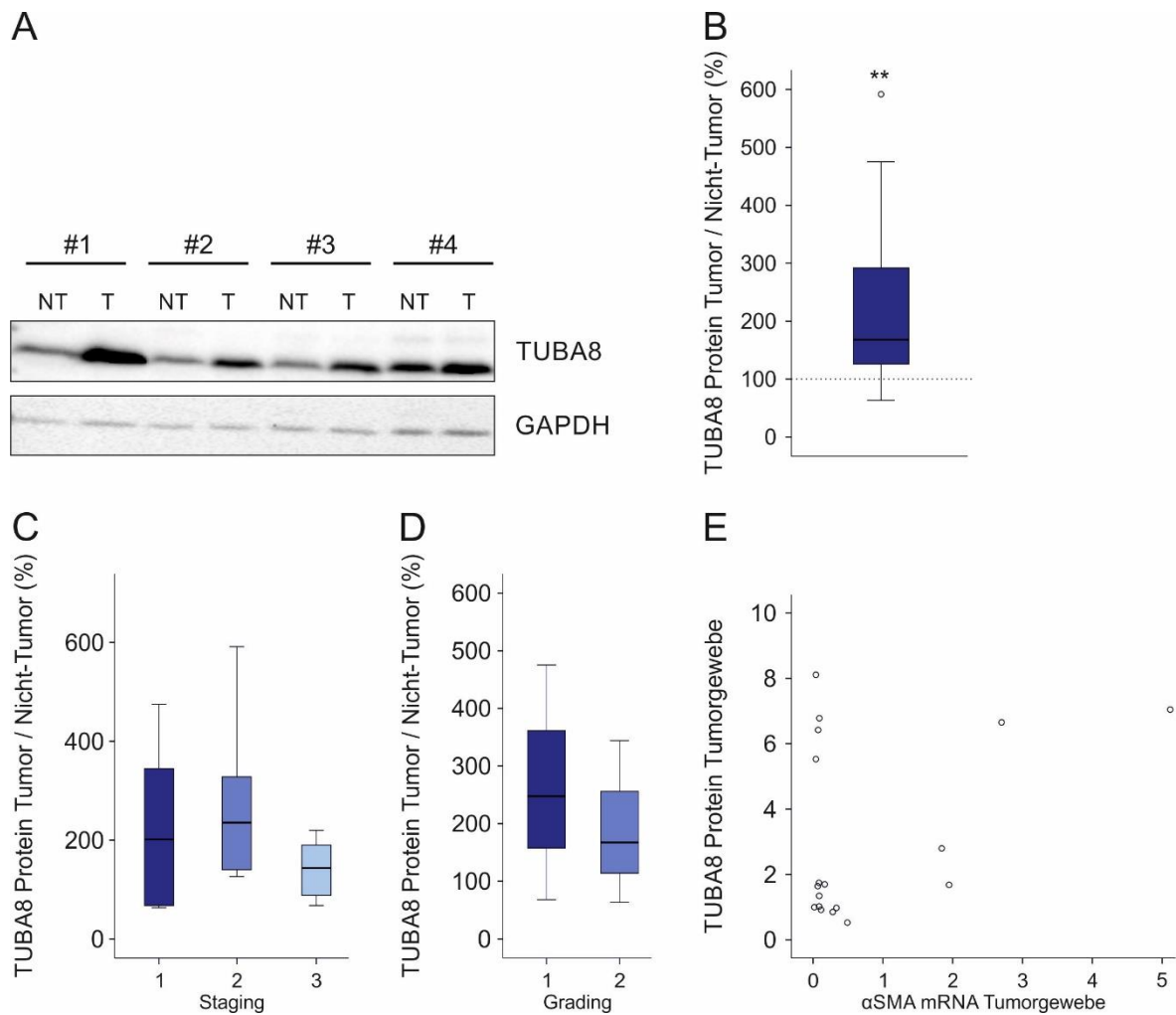


Abbildung 44: TUBA8-Protein-Expression im humanen HCC. A Exemplarischer Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression im Nicht-Tumorgewebe (NT) und Tumorgewebe (T) von vier Patienten (# 1 - 4). Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Verhältnis der TUBA8-Protein-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Nicht-Tumorgewebe in Prozent. C Verhältnis der TUBA8-Protein-Expression im Tumorgewebe zum Nicht-Tumorgewebe klassifiziert nach dem Staging der Tumore. D Verhältnis der TUBA8-Protein-Expression im Tumorgewebe zum Nicht-Tumorgewebe klassifiziert nach dem Grading der Tumore. E Korrelation der TUBA8-Protein-Expression und der αSMA-mRNA-Expression im Tumorgewebe. n = 18; ** p < 0,01.

3.3.4 TUBA8- und SNTA-Expression in der murinen NAFLD

Da TUBA8 in hepatischen Sternzellen exprimiert ist, wurde dessen Proteinlevel in der NAFLD untersucht. Diese Analysen wurden mit Leberlysaten von Mäusen nach Fütterung einer Hochfettdiät, einer Paigendiät und einer MCD-Diät durchgeführt. Um den Effekt der SNTA-Defizienz auf die Expression von TUBA8 zu klären, wurden Wildtyp- und SNTA $-/-$ Mäusen analysiert.

Zur Untersuchung der hepatischen Steatose wurde innerhalb von 14 Wochen Hochfettdiät bei Wildtyp-Mäusen eine Adipositas induziert [209]. Wie bereits im DNA-Microarray

gezeigt, konnte dabei auf Hochfettdiät eine hoch signifikant ($p = 0,006$) niedrigere TUBA8-mRNA-Expression bei den SNTA $-/-$ Mäusen im Vergleich zum Wildtyp bestätigt werden. Zusätzlich wurde eine signifikant ($p = 0,02$) höhere TUBA8-Expression bei den Wildtyp-Tieren auf Hochfettdiät im Vergleich zur Standarddiät festgestellt (siehe Abbildung 45 A). Die TUBA8-Protein-Expression zeigte hinsichtlich des Vergleichs der Genotypen eine Differenz zur mRNA-Expression. Dabei war die TUBA8-Expression sowohl auf Standarddiät, als auch auf Hochfettdiät teilweise signifikant in den Lebern der Knockout-Tiere erhöht (siehe Abbildung 45 B - D). Im Vergleich der verschiedenen Diäten zeigten sich die Ergebnisse konform. Es ergab sich weder bei den Wildtyp-, noch bei den SNTA $-/-$ Mäusen ein Unterschied in der TUBA8-Protein-Expression zwischen Standarddiät und Hochfettdiät (siehe Abbildung 45 B).

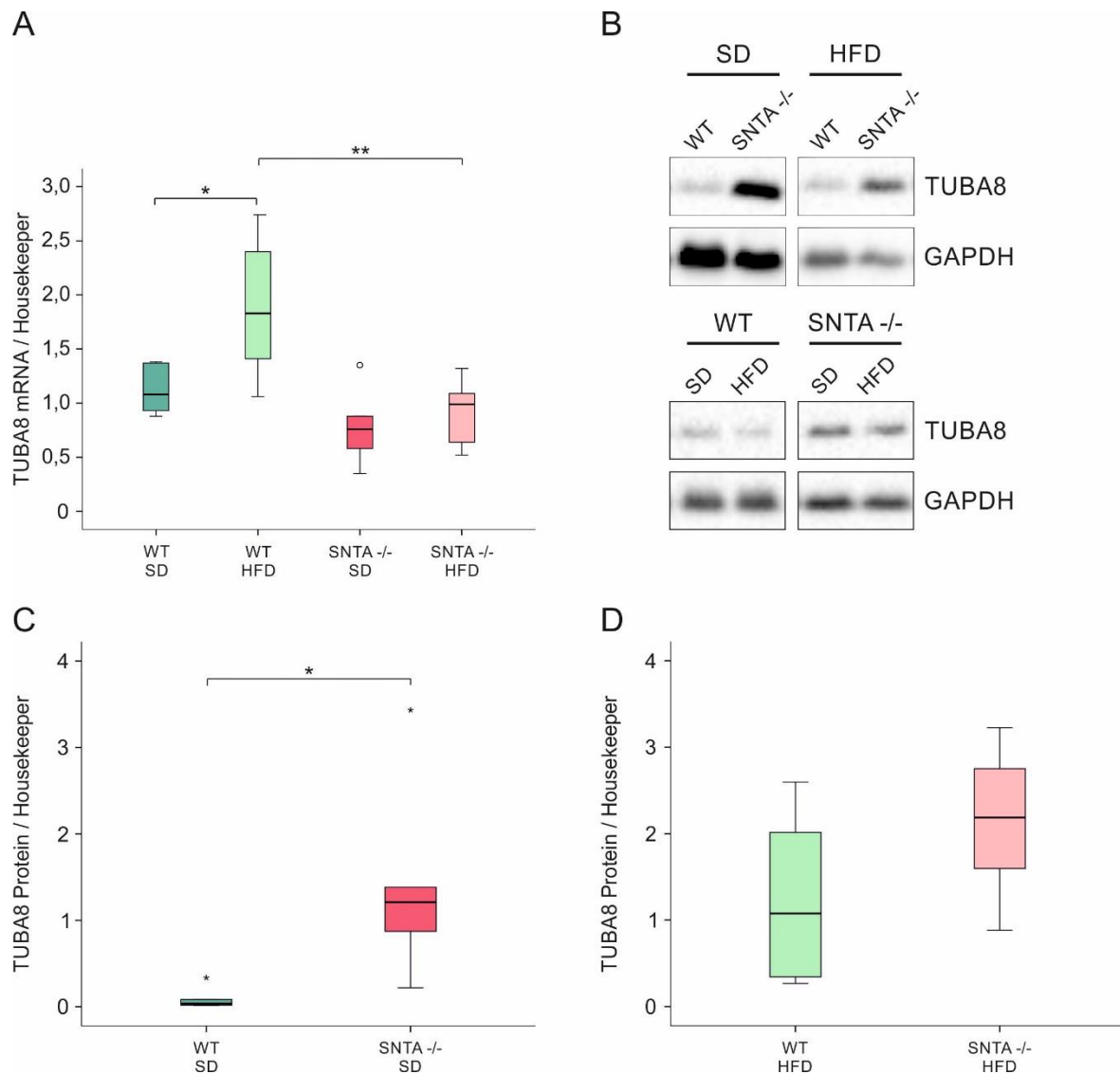


Abbildung 45: Hepatische TUBA8-Expression von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- (SD) und der Hochfettdiät (HFD). A TUBA8-mRNA-Expression. B Exemplarischer Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. C Quantifizierung der TUBA8-Protein-Expression der Mäuse auf SD durch densitometrische Vermessung. D Quantifizierung der TUBA8-Protein-Expression der Mäuse auf HFD durch densitometrische Vermessung. n = 6; * p < 0,05; ** p < 0,01.

Des Weiteren wurde die hepatische TUBA8-mRNA- und Protein-Expression in Wildtyp- und SNTA -/- Mäusen in der NASH-induzierenden MCD- bzw. MCDK-Diät analysiert. Dabei konnte weder auf mRNA-, noch auf Proteinebene ein Unterschied im Expressionslevel zwischen den Genotypen festgestellt werden (siehe Abbildung 46 A - C). Es zeigte sich lediglich ein Effekt zwischen den Diäten. Die TUBA8-Protein-Expression war sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTA -/- Mäusen auf MCD-Diät hoch signifikant (p = 0,006) bzw. signifikant (p = 0,031) erhöht (siehe Abbildung 46 B, C).

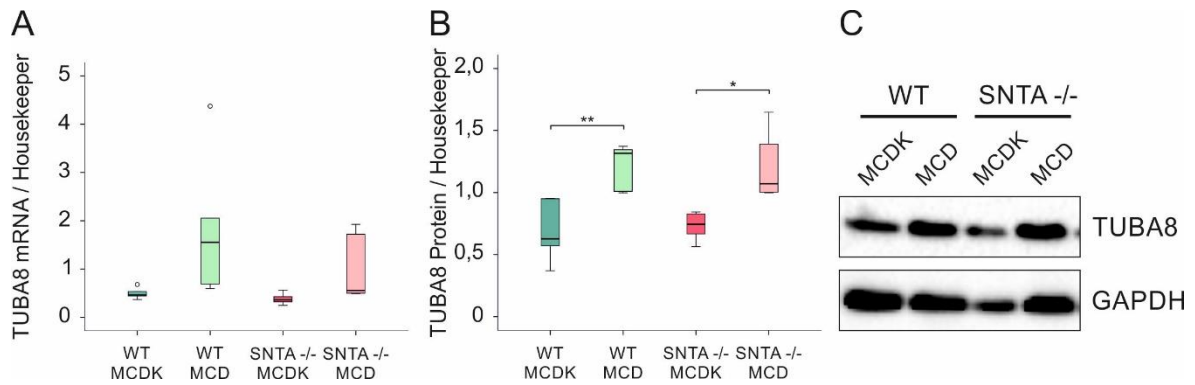


Abbildung 46: Hepatische TUBA8-Expression von Wildtyp (WT)- und SNTA^{-/-}-Mäusen nach zweiwöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. A TUBA8-mRNA-Expression. B Quantifizierung der TUBA8-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. C Exemplarischer Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. n = 5 – 7; * p < 0,05; ** p < 0,01.

Bei der NASH-induzierenden atherogenen Paigendiät war die TUBA8-mRNA-Expression bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf Standarddiät hoch signifikant (p = 0,006) niedriger. Der Unterschied zwischen den Diäten lag lediglich bei den Wildtyp-Tieren höchst signifikant (p < 0,001) vor (siehe Abbildung 47 A). Auf Proteinebene zeigten sich weder im Vergleich zwischen den Diäten, noch zwischen den Genotypen eine signifikante Differenz (siehe Abbildung 47 B, C).

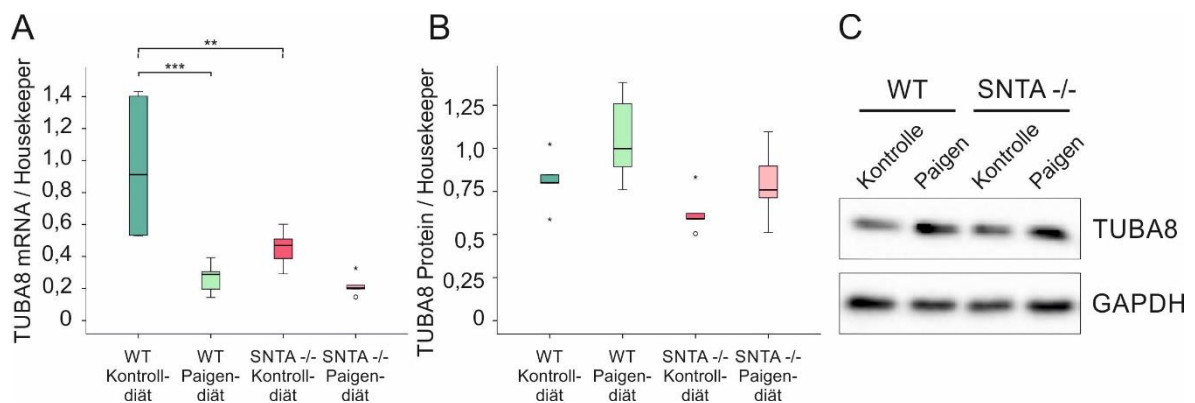


Abbildung 47: Hepatische TUBA8-Expression von Wildtyp (WT)- und SNTA^{-/-}-Mäusen nach zwölfwöchiger Fütterung der Kontroll- und Paigendiät. A TUBA8-mRNA-Expression. B Quantifizierung der TUBA8-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. C Exemplarischer Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. n = 6; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.3.5 TUBA8- und SNTA-Protein-Interaktion *in vitro*

Da das TUBA8-Protein in den Lebern der SNTA-defizienten Tiere bei Fütterung der Standarddiät erhöht war, wurde untersucht, ob sich ein vergleichbarer Effekt *in vitro* nachweisen lässt. Dazu wurde in der murinen Hepa1-6 Zelllinie SNTA mittels siRNA

herunterreguliert (siehe Abbildung 48 C) und das Expressionslevel von TUBA8 auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Die mRNA-Expression zeigte dabei keine Veränderung (siehe Abbildung 48 A). Die TUBA8-Protein-Expression dagegen stieg durch den Knockdown von SNTA signifikant ($p = 0,032$) an (siehe Abbildung 48 B, C). Die Effizienz des SNTA-Knockdowns auf mRNA-Ebene wurde bereits in Abschnitt 3.2.2.4.4 gezeigt.

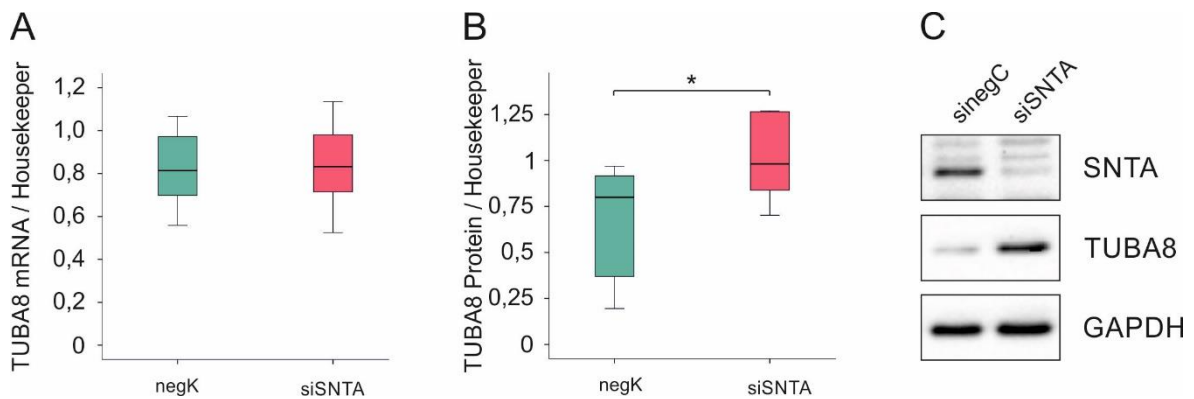


Abbildung 48: TUBA8-Expression in Hepa1-6 Zellen mit herunterregulierter SNTA-Expression mittels siRNA. A TUBA8-mRNA-Expression. B Quantifizierung der TUBA8-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. C Exemplarischer Immunoblot der TUBA8-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. $n = 9$; * $p < 0,05$.

Zusätzlich zum *in vitro* SNTA-Knockdown wurde SNTA mit Hilfe eines HaloTag Plasmids (pHTN) überexprimiert, um die Auswirkungen auf die Expression von TUBA8 zu untersuchen. Die Größe des HaloTags liegt bei 33 kDa und die Größe des endogenen SNTAs bei 55 kDa. Zusammen ergab sich für das exogene SNTA eine Größe von 88 kDa. Die Detektion des HaloTags zeigte eine Überexpression von SNTA bei 88 kDa. Die TUBA8-Protein-Expression wurde als hoch signifikant ($p = 0,007$) erniedrigt in den SNTA überexprimierenden Zellen ermittelt. Eine Detektion aller α -Tubuline wies keine Expressionsveränderung auf (siehe Abbildung 49 A, B).

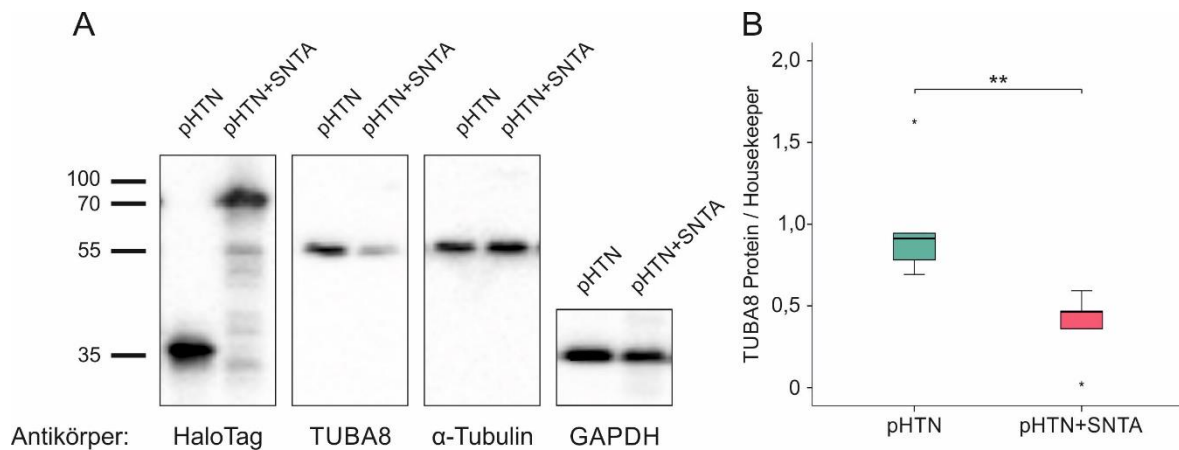


Abbildung 49: TUBA8 und α -Tubulin in Hepa1-6 Zellen, die ein SNTA HaloTag Fusionsprotein (pHTN+SNTA) überexprimieren. A HaloTag, TUBA8- und α -Tubulin-Protein-Expression. Die GAPDH-Protein-Expression diente als Ladekontrolle. B Quantifizierung der TUBA8-Protein-Expression durch densitometrische Vermessung. n = 6; ** p < 0,01.

Um eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine zu überprüfen wurden Präzipitationsexperimente durchgeführt. Dabei wurde einmal das exogene SNTA mit den möglichen Interaktionspartnern mit Hilfe des fusionierten HaloTags präzipitiert und die am SNTA gebundenen Proteine eluiert. Mittels eines Western Blots konnte TUBA8 als Interaktionspartner identifiziert werden (siehe Abbildung 50 A). Umgekehrt konnte bei einer Präzipitation des exogenen TUBA8 welches als Fusionsprotein mit dem HaloTag exprimiert wurde keine Interaktion mit SNTA festgestellt werden. Dagegen zeigte sich eine Interaktion zwischen dem exogenen SNTB2 und dem endogenen TUBA8 (siehe Abbildung 50 A). Zur Überprüfung der Überexpression wurden die Fusionsproteine SNTA, SNTB2 und TUBA8 vom HaloTag mittels einer TEV-Protease abgespalten. Die Überexpression war bei SNTA am stärksten (siehe Abbildung 50 B). Dieser Versuch wurde bisher nur einmal durchgeführt und muss in nachfolgenden Arbeiten verifiziert werden.

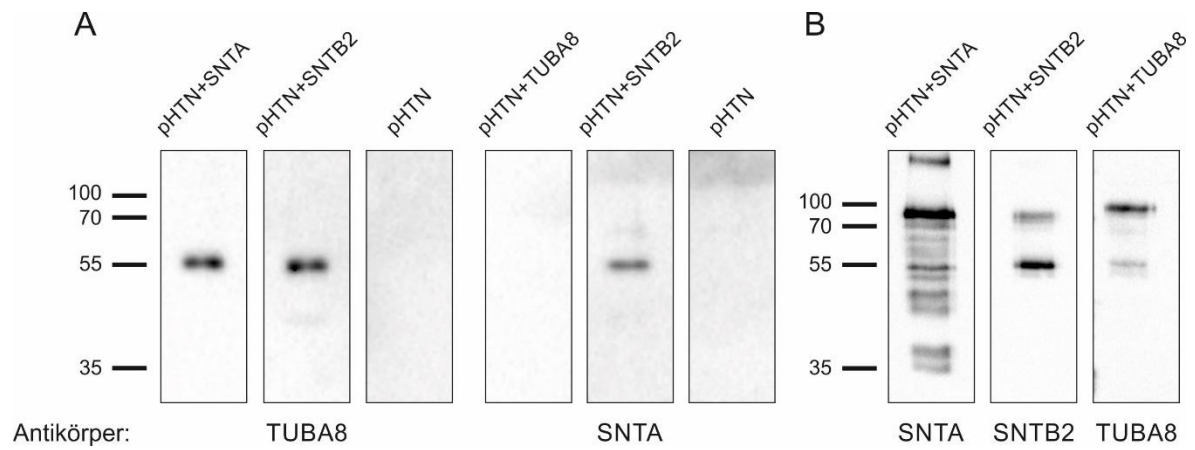


Abbildung 50: Interaktionen in Hepa1-6 Zellen, die ein SNTA, SNTB2 oder ein TUBA8 HaloTag Fusionsprotein (pHTN+SNTA, +SNTB2, +TUBA8) überexprimieren. A Nachweis des präzipitierten TUBA8- und SNTA-Proteins. B Nachweis der Überexpression. n = 1; ** p < 0,01.

4 Diskussion

4.1 SNTA in der humanen NAFLD

SNTA ist ein Adapterprotein, gehört zur Familie der Syntrophine und wird in den Hepatozyten, den hepatischen Sternzellen (Daten nicht gezeigt) und höchstwahrscheinlich den Kupffer-Zellen exprimiert [134, 136]. Zusätzlich lässt sich SNTA nicht nur in der Leber sondern auch in vielen anderen Geweben wie dem Skelettmuskel, dem Herzen, dem Gehirn und dem Fettgewebe nachweisen [149]. Aufgrund des strukturellen Aufbaus -bestehend aus verschiedenen Interaktionsdomänen- kann SNTA Bindungen mit den unterschiedlichsten Interaktionspartnern eingehen. Dazu gehören das Dystrophin als Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes, ABCA1, welches im Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle spielt sowie weitere Rezeptoren, Kanalproteine oder Signalmoleküle [149]. Da SNTA über diese Wechselwirkungen an verschiedenen zellulären Prozessen und Signalwegen beteiligt ist und in den Leberzellen exprimiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass SNTA auch in diesem Organ verschiedene Prozesse beeinflusst. In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf seiner Rolle in der Pathogenese der NAFLD.

Die hepatische Expression von SNTA wurde in der humanen NAFLD untersucht. Die Haupte Erkenntnis aus dieser Studie war, dass die SNTA-mRNA-Expression negativ mit den histologischen Parametern der NASH, wie dem Steatosegrad, dem Entzündungsgrad und dem Fibrosegrad korreliert.

4.1.1 Negative Korrelation zwischen SNTA-mRNA-Expression und Charakteristika der NASH

Innerhalb des NASH-Scores werden unter anderem die drei wichtigsten Parameter der NASH, die Steatose, die Entzündung und die Fibrose, nach einem Wertesystem histologisch beurteilt, um die Schwere der Erkrankung einordnen zu können. Die SNTA-mRNA-Expression korrelierte negativ mit diesen drei Parametern und somit auch mit dem NASH-Score.

Die negative Korrelation von SNTA mit dem Entzündungsgrad könnte auf eine geringere SNTA-Expression in den Makrophagen zurückzuführen sein. Laut Tamehiro *et al.* bewirkt die SNTA- und SNTB2-Defizienz in Makrophagen eine stärkere Entzündungsreaktion bei einer LPS Stimulation [134]. Zusätzlich könnte auch die erhöhte Expression von ERK, welches zur hepatischen Entzündung beiträgt und in der Leber der SNTA / SNTB2-Doppelknockout-Mäusen aktiviert vorliegt, für eine Rolle der Syntrophine in der Entzündung sprechen [136, 210, 211]. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass

es sich dabei ausschließlich um einen Effekt von SNTB2 und nicht von SNTA handelt. Experimente zur Untersuchung der Funktion von SNTA in den verschiedenen Zellarten der Leber sollten zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

Die Assoziationsanalyse ergab weiterhin eine negative Korrelation der SNTA-mRNA-Expression mit dem Grad der Lebersteatose. Der Knockdown von SNTA in Adipozyten verminderte das Wachstum der Lipidtröpfchen und die Triglyzeridspeicherung [169]. Diese Erkenntnisse würden für eine geringere Lipidakkumulation bei niedriger SNTA-Expression sprechen. Ob die Funktion von SNTA auf die Speicherung von Lipiden in den unterschiedlichen Geweben entgegengesetzt ist, bedarf weiteren Studien in Hepatozyten.

Die NAFLD geht mit vielen verschiedenen Komorbiditäten einher, wie Hypertension, Hypercholesterinämie sowie auch Typ-2-Diabetes [26]. Bei der Überprüfung einer Assoziation der SNTA-mRNA-Expression mit diesen Komorbiditäten zeigte sich bei den NASH-Patienten mit Typ-2-Diabetes eine erhöhte SNTA-mRNA-Konzentration im Vergleich zu den NASH-Patienten, die nicht an Typ-2-Diabetes erkrankt waren. Nach dem Ausschluss der Typ-2-Diabetes-Patienten aus der gesamten Kohorte konnte die negative Korrelation zwischen der SNTA-mRNA-Expression und dem Steatosegrad, dem Entzündungsgrad sowie dem Fibrosegrad erneut bestätigt werden, was einen entscheidenden Einfluss von Typ-2-Diabetes auf diese Assoziationen ausschließt.

Der Fibrosegrad war bei Patienten mit einer NASH und Typ-2-Diabetes erhöht. Dies bestätigt Studien, die zeigen, dass eine Insulinresistenz die hepatische Fibroseentwicklung fördert [212]. Der Entzündungsgrad dagegen war bei NASH-Patienten mit Typ-2-Diabetes erniedrigt. Und das obwohl die Entzündung die Fibrose fördert [213] und die hepatische Insulinresistenz einen Risikofaktor in der Entstehung von Entzündung und Fibrose darstellt [32].

Im Gegensatz zu den Charakteristika der NASH wies SNTA keine Assoziation mit Parametern wie dem Geschlecht, dem BMI oder den verschiedenen Lebererkrankungen, aufgrund derer der operative Eingriff erfolgte, auf.

4.1.2 Positive Korrelation zwischen SNTA und SR-BI, einem wichtigen Protein des Cholesterintransports

In der untersuchten NAFLD-Kohorte zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der SNTA- und der SR-BI-mRNA-Expression. SR-BI ist als HDL-Rezeptor ein wichtiges Glied im reversen Cholesterintransport [171, 172]. Die positive Korrelation zwischen diesen

beiden Proteinen kann mit der Tatsache vereinbart werden, dass in SNTA / SNTB2 -/- Mäusen eine Reduktion von SR-BI festgestellt wurde [136]. SNTA hat also eine Funktion in der hepatischen SR-BI-Expression. Eine direkte Bindung von SNTA an SR-BI konnte mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimenten aber ausgeschlossen werden. Des Weiteren führt der Knockdown von SNTA in Hepatozyten nicht zu einer verminderten SR-BI-Protein-Expression.

Die hepatische SR-BI-Expression korreliert lediglich mit dem Fibrosegrad. Der Steatosegrad, der Entzündungsgrad sowie der NASH-Score selbst standen in keiner Assoziation zu der SR-BI-Expression in der untersuchten NAFLD-Kohorte. Cai *et al.* und Song *et al.* dagegen haben eine enge Assoziation zwischen SR-BI und der Entzündung nachgewiesen. SR-BI ist dabei an der inflammatorischen Antwort auf LPS durch Makrophagen beteiligt, wobei sich ein stärkerer Entzündungsgrad bei primären SR-BI-Knockout-Makrophagen zeigt [214, 215]. Da die Entzündung und die Fibrose in der Pathogenese der NASH eng miteinander verbunden sind, könnte SR-BI in der Progression der Fibrose eine Rolle spielen.

Die antiinflammatorische Rolle von SR-BI und die Korrelation mit SNTA könnten auch mit der möglichen antiinflammatorischen Funktion von SNTA in Verbindung stehen. Da eine stabilisierende Rolle von SNTA für SR-BI als eher unwahrscheinlich gilt, müssen weitere Versuche die Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen aufklären.

4.1.3 Keine Korrelation zwischen SNTA und MnSOD, einem antioxidativem Protein

In der Pathogenese der NAFLD spielt der oxidative Stress in den Zellen eine tragende Rolle. Die Expression von MnSOD, welches die Zellen vor ROS schützt, ist in der NAFLD erniedrigt [175]; es ergab sich jedoch keine Korrelation mit der SNTA-mRNA-Expression. In Adipozyten dagegen liegt die MnSOD bei einem SNTA-Knockdown reduziert vor [169].

4.1.4 Expression von SNTA ist im HCC unverändert

Ein HCC kann sich aus einer NASH direkt oder über eine Zirrhose entwickeln [26]. Bei der Analyse der SNTA-Protein-Expression im HCC ergab sich kein Unterschied im Vergleich von Tumorgewebe und angrenzendem Nicht-Tumorgewebe. Ähnliches ergaben auch Untersuchungen beim Magen-, Kolon-, Rektum- und Lungenkarzinom [103, 148]. Dagegen war SNTA in anderen Karzinomen, wie Ösophagus- und Brustkrebs, differenziell exprimiert [103].

4.2 Syntrophine in der murinen NAFLD

Da es kein optimales murines NASH-Modell gibt, wurden zur Induktion einer NASH zwei verschiedene Diätmodelle eingesetzt [216]. Zum einen die MCD-Diät, die innerhalb kürzester Zeit eine hepatische Entzündung und Fibrose auslöst, welche sich aber in den hier untersuchten Mäusen noch nicht histologisch manifestiert hatte. Zum anderen wurde die atherogene Paigendiät verfüttert, die ebenfalls eine NASH auslöst. [154, 155].

Die Analysen zeigten, dass die SNTA-Knockout-Mäuse lediglich im MCD-Modell vor der hepatischen Entzündung geschützt sind. SNTA kann folglich unter bestimmten Bedingungen die Progression der benignen Steatose zur NASH bewirken. Die hepatische Expression von SNTA war in der NASH-induzierenden MCD-Diät im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolldiäten unverändert, im Gegensatz zu einer etwa zweifachen Erhöhung in der Paigendiät. Hier muss geklärt werden, ob die SNTA-Expression in einzelnen Zellpopulationen in der NASH ansteigt. Die erhöhte Expression muss aber nicht notwendigerweise eine Folge der NASH sein. Die verfütterten Diäten unterscheiden sich im Gehalt der Bruttoenergie: während die MCD- und die MCDK-Diät den gleichen Energiegehalt aufweisen, ist die Paigendiät um 25 % gehaltvoller als die dazugehörige Kontrolldiät.

4.2.1 SNTA in der murinen NASH

4.2.1.1 Analyse der Fettgewebe der SNTA-Knockout-Mäuse in der NASH

Als endokrines Organ und Speicherort für Energie spielt das Fettgewebe eine wichtige Rolle in der Pathogenese der NASH [26, 56]. Daher wurden die Gewichtsveränderungen in den verschiedenen NASH-induzierenden Diätmodellen analysiert.

SNTA $-/-$ Mäuse haben weniger an subkutanem wie auch intraabdominell weißem Fettgewebe durch die Verfütterung der MCD-Diät verloren. Die SNTA-Defizienz schützte die Mäuse vor dem Diät-induzierten Gewichtsverlust, was sich auch auf das Körpergewicht auswirkte. Auch hier war der Gewichtsverlust geringer ausgeprägt. Auch das Serumlevel des antiinflammatorischen Adipokins Adiponektin, welches bei schlanken Individuen im Serum erhöht ist [177], war unverändert. Lediglich bei den Wildtyp-Mäusen war Adiponektin nach MCD-Diät erhöht. Dieser Befund deutet darauf hin, dass bei den SNTA $-/-$ Mäusen mehr Triglyzeride in den Fettdepots gespeichert werden, als bei den Wildtyp-Tieren. Ob vermehrtes Adiponektin nun lediglich als Folge des Gewichtsverlusts oder als Konsequenz einer verringerten hepatischen Elimination zu bewerten ist, lässt sich mit diesem Versuchsansatz nicht klären. Eine veränderte Lipolyse kann als Grund für

die unterschiedliche genotypspezifische Gewichtsabnahme ausgeschlossen werden, da sich die Protein-Expression der Lipasen ATGL (*adipose triglyceride lipase*) und HSL (*hormone sensitive lipase*) zwischen den Genotypen nicht unterschied (Daten nicht gezeigt).

Im Tiermodell der Paigendiät zeigte sich lediglich im epididymalen Fettgewebe eine signifikant geringere Gewichtszunahme bei den SNTA $-/-$ Mäusen. Im perirenal und subkutanen Fettgewebe lag lediglich eine Tendenz vor. Entsprechend war das Serum Adiponektin ausschließlich bei den Wildtyp-Mäusen signifikant erniedrigt. Auf das Körpergewicht hatte die Diät keinen Einfluss. Auch Matsuzawa *et al.* beschrieben in diesem Modell eine NASH wobei keine Gewichtszunahme zu beobachten war [155].

4.2.1.2 Analyse des hepatischen Lipidmetabolismus der SNTA-Knockout-Mäuse in der NASH

Die Lebersteatose trat bei den SNTA-Knockout-Mäusen sowohl bei der Paigendiät als auch bei der MCD-Diät auf. Dabei verursacht die Cholin-Defizienz einen Mangel an einem wichtigen Bestandteil des VLDLs, dem Phosphatidylcholin. Dies beeinträchtigt den Transport von Triglyzeriden aus der Leber in den Blutkreislauf [153]. Ursache für die Steatose bei der Paigendiät ist hingegen die erhöhte Zufuhr von Energie mit der Nahrung.

Die Fettsäuresynthese ist bei einer MCD-Diät in der Leber herunterreguliert, da die Expression der an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteine SREBP1c, SCD1 und FAS erniedrigt ist [153, 217]. Dies konnte in den hier untersuchten Wildtyp-Tieren bestätigt werden. Bei den SNTA-defizienten Tieren zeigten sich dagegen keine signifikanten Expressionsveränderung dieser Proteine. Bei Verfütterung der Paigendiät findet dagegen eine entgegengesetzte Regulation statt. Hierbei war, konform mit der Literatur, die Expression von SREBP1c und SCD1 hochreguliert [218]. Die FAS-Protein-Expression zeigte dagegen keine diätspezifische Veränderung. Dorn *et al.* konnten dies bereits auf mRNA-Ebene im Mausmodell und auch bei NASH-Patienten zeigen [219]. Die unterschiedliche Regulation der Fettsäuresynthese unterstreicht die Tatsache, dass in den beiden NASH-induzierenden Diäten verschiedene Mechanismen zur hepatischen Steatose beitragen.

Die am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteine ERK, SR-BI und PDZK1 zeigten im MCD-Diätmodell sowie im Paigendiätmodell weder diätspezifische, noch genotypspezifische Veränderungen. Im Gegensatz dazu wurden in SNTA / SNTB2-

Doppelknockout-Mäusen auf einer Hochfettdiät eine erniedrigte SR-BI-Expression detektiert [136]. Dies zeigt, dass die SNTB2-Defizienz oder sogar der Knockout beider Syntrophine für diese Regulation verantwortlich ist.

Caveolin-1, ein Bestandteil der Caveolae in der Plasmamembran [220], war sowohl bei den Wildtyp-, als auch bei den SNTA -/- Mäusen auf Paigendiät erniedrigt exprimiert. Es ist bekannt, dass Caveolin-1 in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt. Eine Defizienz von Caveolin-1 wirkt protektiv gegen die Bildung von Aortenatherome und inhibiert verschiedene proatherogene Moleküle [221]. Die veränderte Expression von Caveolin-1 durch die atherogene Paigendiät könnte daher eher im Zusammenhang mit der Pathogenese der Atherosklerose und nicht mit der Pathogenese der NASH stehen.

4.2.1.3 Einfluss des SNTA-Knockouts auf Merkmale der NASH

4.2.1.3.1 Entzündung

Die Analysen der mit einer NASH einhergehenden Entzündung zeigten, dass die SNTA-Defizienz die Mäuse vor einer MCD-Diät-induzierten Entzündung, jedoch nicht vor einer Paigendiät-induzierten Entzündung schützt. Die Level der gebräuchlichen Makrophagenmarker F4/80 und CD68 lagen bei beiden Genotypen auf Paigendiät, wie auch bei den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät, über 50 % erhöht vor. Im Gegensatz dazu wies die Expression bei den SNTA-defizienten Mäusen keinen MCD-diätspezifischen Unterschied auf. Histologisch konnte dieses Ergebnis über eine CD163 Färbung, eines spezifischen Makrophagenmarkers, untermauert werden.

Die natürlichen Killerzellen, welche zu den Lymphozyten des angeborenen Immunsystems gehören, besitzen eine zytotoxische Aktivität, welche Apoptose auslösen kann. In der Leber tragen natürliche Killerzellen durch die Sezernierung von Zytokinen zur Schädigung von Hepatozyten bei [222]. Im MCD-Tiermodell zeigte sich aber weder eine diätspezifische, noch eine genotypspezifische Veränderung im Expressionslevel der natürlichen Killerzellmarker Ly49C und NCR1.

Die CD4⁺-T-Helferzellen und die CD8⁺-zytotoxischen-T-Zellen spielen ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese der NASH. Bei CD4 und CD8 handelt es sich um Rezeptoren, welche auf T-Zellen lokalisiert sind. Bei Aktivierung schütten diese Zellen Zytokine aus; ein Effekt der im Alter stärker ausgeprägt ist [223]. Bei beiden Genotypen lag die Expression von CD4 auf MCD-Diät, im Vergleich zur MCDK-Diät, niedriger vor. Zwischen den Genotypen

konnte dagegen kein Unterschied verzeichnet werden. Die Expression von CD8 wies weder diätspezifische-, noch genotypspezifische Veränderungen auf. Die CD4⁺-T-Helferzellen und die CD8⁺-zytotoxischen-T-Zellen scheinen somit keine Rolle bei der verminderten Entzündung in den Lebern der mutierten Tiere zu spielen. Über die Expression von CD4 und CD8 bei einer atherogenen Paigendiät ist meines Wissens nichts bekannt. Hierbei zeigte sich aber ein genotypspezifischer Unterschied. Während die Expression sowohl von CD4 und auch CD8 durch die Paigendiät erhöht wurde, fand sich bei den SNTA-defizienten-Mäusen kein Unterschied. Einschränkend muss hier betont werden, dass lediglich die mRNA-Expression untersucht wurde. Eine FACS-Analyse der aus den jeweiligen Lebern gewonnenen Immunzellen muss klären, welche der verschiedenen Immunzellpopulationen betroffen ist.

4.2.1.3.2 Fibrose

Die MCD-Diät, wie auch die Paigendiät-induzieren Fibrose [152-155]. Zur Untersuchung dieses NASH-Parameters wurde die Expression verschiedener Fibrosemarker, TGF β , CTGF und α SMA, analysiert. Dabei zeigte sich auf molekularer Ebene bei der MCD-Diät ein Schutz der SNTA -/- Mäuse vor der Fibroseinduktion. TGF β und auch CTGF lagen nur bei den Wildtyp-Mäusen auf MCD-Diät erhöht vor. Die α SMA-mRNA-Expressionsmessung zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede. Kassel *et al.* konnten jedoch eine erhöhte α SMA-Protein-Expression in der Leber bei Fütterung einer MCD-Diät zeigen. Die Mäuse wurden in dieser Studie allerdings auch vier Wochen lang gefüttert, im Gegensatz zu den zwei Wochen in dieser Arbeit [224]. Die Erhöhung der α SMA-Expression könnte sich also zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht ausgeprägt haben. Neben der molekularen Analyse der Fibrose wurde diese auch histologisch bewertet. Dabei konnte bestätigt werden, dass sich weder in den Wildtyp- noch in den SNTA -/- Mäusen die Fibrose zu diesem Zeitpunkt in der Leber manifestieren konnte.

Bei der Paigendiät dagegen, welche in einer Zeitspanne von zwölf Wochen gefüttert wurde, konnten sowohl auf molekularer Ebene durch die α SMA-Expressionsmessung, wie auch histologisch durch die Sirius-Red-Färbung, fibrotische Veränderungen in der Leber beider Genotypen festgehalten werden.

Die SNTA-Defizienz schützt die Mäuse somit zwar vor einer beginnenden Fibrose induziert durch die MCD-Diät, aber nicht vor einer Fibrose induziert durch die Paigendiät.

4.2.1.3.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird als ein Schlüsselement der NASH-Pathogenese angesehen und ist einer der in der *multiple-hit* Hypothese für die Entstehung der NAFLD beschriebenen Faktoren [38]. In den verschiedenen Diätmodellen wurde der oxidative Stress einmal mittels der Messung des MDA-Levels, ein Produkt des oxidativen Stresses, und einmal über die Protein-Expressionsanalyse von MnSOD, einem antioxidativen Enzym, bestimmt. Hierbei zeigten sich sowohl im MCD-Diätmodell als auch im Paigendiätmodell protektive Effekte des SNTA-Knockouts. Die hepatische MDA-Konzentration lag bei den SNTA $-/-$ Mäusen weder bei der MCD- noch bei der Paigendiät erhöht vor und lässt eine Rolle von SNTA im oxidativen Stress Metabolismus vermuten. Diese Theorie wird durch die Studie von Moon *et al.*, in der SNTA in Myoblasten die Catalase stabilisiert und dadurch den oxidativen Stress minimiert, nicht unterstützt [143]. SNTA scheint in unterschiedlichen Geweben entgegengesetzte Funktionen aufzuweisen. Dies bestätigt auch die Expressionsanalyse von MnSOD, welche im MCD-Diätmodell keine signifikanten Unterschiede ergab. Im Gegensatz dazu führte *in vitro* ein SNTA-Knockdown in 3T3-L1 Zellen, einer Fibroblasten Zelllinie, zu einer differenziellen Expression von MnSOD [169]. Dies zeigt wie unterschiedlich die Funktion von SNTA in verschiedenen Geweben sein kann und wie wichtig es ist die Untersuchungen gewebspezifisch durchzuführen.

4.2.1.4 SNTA-Defizienz schützt vor den Folgen der Methionin-Defizienz

Bei der MCD-Diät führt ausschließlich die Cholin-Defizienz aufgrund des Mangels an VLDL zu einer Lipidakkumulation in der Leber. Dieser Effekt ist unabhängig vom Gewichtsverlust und führt nicht zur hepatischen Entzündung [152]. Dafür ist ausschließlich die Methionin-Defizienz verantwortlich: diese bewirkt die Gewichtsreduktion, die Leberinflammation und den oxidativen Stress – genau die Parameter, die durch die SNTA-Defizienz positiv beeinflusst wurden. Die SNTA $-/-$ Mäuse scheinen ausschließlich vor den Effekten der Methionin-Defizienz, aber nicht vor den Auswirkungen der Cholin-Defizienz, geschützt zu sein.

4.2.2 SNTB2 in der murinen NASH

SNTB2 ist wie SNTA ein Adapterprotein und ebenfalls mit dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex assoziiert [149]. Dazu kommt die Bindung an weitere Proteine, die unter anderem eine Rolle im Lipidmetabolismus spielen, wie ABCA1. Zusätzlich zeigte sich in SNTB2-defizienten Mäusen eine veränderte Expression von Caveolin-1 im weißen

Fettgewebe, wie auch der Leber und eine veränderte Funktionalität der Adipozyten (Promotion Frau Dr. Sabrina Krautbauer).

In dieser Arbeit wurde daher auch die Rolle von SNTB2 in der MCD-Diät-induzierten murinen NASH untersucht. Dabei zeigte sich aber weder bei der diätspezifischen Gewichtsreduktion, noch der Entzündung, der Fibrose oder des oxidativen Stresses ein genotypspezifischer Unterschied. Die SNTB2-Defizienz schützt die Mäuse nicht vor einer MCD-Diät-induzierten NASH.

Obwohl eine strukturelle Homologie zwischen SNTB2 und SNTA besteht, werden die Funktionen des jeweiligen anderen Proteins nicht komplementiert [101, 149]. Des Weiteren findet sich auch eine unterschiedliche gewebsspezifische Expression. SNTA ist vor allem im Skelettmuskel, dem Herzen, dem Gehirn und weiteren Geweben exprimiert, SNTB2 ubiquitär im ganzen Körper [101, 103]. Auch die intrazelluläre Lokalisation unterscheidet sich [105]. Dies und die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Isoformen spezifische Aufgaben erfüllen.

4.2.3 SNTA in der murinen Fettleber

Die NAFLD geht häufig mit einer Insulinresistenz einher, welche die Pathogenese der NASH fördert [26]. Untersuchungen im Skelettmuskel von Frauen mit Gestationsdiabetes sowie diabetischen Ratten zeigen eine verminderte SNTA-Expression, wodurch eine Rolle für die Insulinresistenz vermutet wurde [107, 108]. Die Bewertung der Insulinresistenz erfolgte bei Wildtyp- und SNTA ^{-/-} Mäusen auf Hochfettdiät über die Expressionsanalyse der aktivierten AKT. AKT ist ein wichtiges Molekül in der Insulinsignalkaskade, welches über seine Insulin vermittelte Aktivierung andere Proteine, wie die Glykogensynthase-Kinase, inhibieren kann [225]. Durch diese Inhibierung wird wiederum die Aktivierung der Glykogensynthase induziert und das Übermaß an Glukose dem Glykogenspeicher zugeführt. Zusätzlich bewirkt das aktive AKT die Präsentation des GLUT4 Glukose-Transporters 4 an der Zelloberfläche von Adipozyten und Muskelzellen und bewirkt die Aufnahme der Glukose in die Zelle [226]. Untersucht wurde die Insulinresistenz in der Leber und den weißen Fettgeweben. Dabei zeigten beide Genotypen auf Standarddiät eine ähnliche Insulinsensitivität in der Leber, in dem subkutanen und dem epididymalen Fettgewebe. Durch die Hochfettdiät haben die Wildtyp-Mäuse, jedoch nicht die SNTA-defizienten Mäuse, eine Insulinresistenz in der Leber und dem subkutanen Fett entwickelt. Im epididymalen Fettgewebe ließ sich nach fettreicher Diät weder bei den Wildtyp-, noch bei den SNTA ^{-/-} Tieren eine verringerte Insulinsensitivität nachweisen. Im perirenal-

Fettgewebe zeigte sich sowohl auf Standarddiät, als auch auf Hochfettdiät keine Aktivierung der AKT bei den Wildtyp-Mäusen. Bei den Knockout-Tieren konnte dies jedoch beobachtet werden.

Die verschiedenen Auswirkungen der Diäten und der Genotypen könnten sich aus den unterschiedlichen Eigenschaften der Fettgewebe erklären. Durch die Fütterung einer Hochfettdiät entsteht zuallererst eine Hypertrophie der Adipozyten. Darauf folgt im epididymalen Fettgewebe bereits nach vier Wochen eine Hyperplasie. Im subkutanen Fettgewebe dagegen tritt eine Hyperplasie auch nach zwölf Wochen Diät nicht auf [227]. Diese unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Fettdepots erklären zum Teil deren verschiedenen Bedeutungen im Metabolismus.

Somit schützt die SNTA-Defizienz die Mäuse vor einer Hochfettdiät-induzierten Insulinresistenz in der Leber und im subkutanen Fett.

4.3 Differenziell exprimierte Gene in den Lebern der SNTA-Knockout-Tiere

4.3.1 Einfluss verschiedener Gene auf Parameter der NAFLD

Mittels eines Affymetrix Gene Chips wurden Gene, die in SNTA $-/-$ Mäusen auf Hochfettdiät im Vergleich zum Wildtyp differenziell exprimiert sind, identifiziert. Dabei wurde eine erniedrigte Expression der inflammatorischen Gene CCL2 (*CC-chemokine ligand 2*) [228], SAA2 [204] und CD11b [229], wie auch der Fibrosemarker COL1A1 [230] und TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) [231] festgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression einiger der differenziell exprimierten Gene in verschiedenen Tiermodellen der NAFLD (Hochfettdiät, MCD-Diät und atherogene Paigendiät) mit Hilfe der semiquantitativen Real-Time PCR verifiziert und analysiert.

Dabei stellte sich heraus, dass die Gene CIDEA und CIDEA, welche die Steatose fördern und in der Fettleber erhöht exprimiert sind [198-200], in den SNTA $-/-$ Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf Hochfettdiät signifikant niedriger exprimiert waren. Dies bestätigte die histologisch eindeutigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Promotion von Frau Dr. Kristina Eisinger), welche in den SNTA $-/-$ Mäusen nach 14 Wochen Hochfettdiät keine hepatische Steatose nachweisen konnte. Der Knockout schützte die Tiere vor der Einlagerung von Triglyzeriden in die Leber, obwohl die Gewichtszunahme und die Futteraufnahme nicht von den Wildtyp-Tieren abwichen. Auch bei der NASH-induzierenden MCD-Diät wurde eine signifikant niedrigere CIDEA-Expression in den SNTA-Knockout-Mäusen detektiert, obwohl diese nicht vor einer Steatose geschützt sind.

CIDEA trägt aber neben der Steatose auch zu oxidativem Stress und Leberschädigung bei [206, 232] –und davor waren die SNTA-defizienten Mäuse geschützt. In der atherogenen Paigendiät dagegen wurde kein genotypspezifischer Unterschied festgestellt. Sowohl bei den Wildtyp-, als auch den Knockout-Mäusen war die Expression von CIDEA signifikant auf Paigendiät im Vergleich zur Kontrolldiät erhöht.

In vitro Versuche haben gezeigt, dass dieser Effekt der verringerten CIDEA-Expression in den Lebern der SNTA -/- Mäusen ein direkter Effekt des Knockdowns in Hepatozyten ist. Warum sich dann keine niedrigere Expression in diesem Diätmodell zeigen lässt, kann momentan nicht erklärt werden.

Die SNTA-Defizienz schützt die Mäuse vor einer Hochfettdiät-, jedoch nicht vor einer MCD-Diät- oder Paigendiät-induzierten Lebersteatose. Während bei mit MCD-Diät gefütterten Tieren die hepatische Steatose primär durch den gestörten Abtransport der Lipide aus der Leber erzeugt wird, tragen die vermehrte Fettaufnahme und erhöhte endogene Lipogenese zur Leberverfettung bei mit Hochfett- bzw. atherogener Paigendiät gefütterten Tieren bei. Somit scheint die SNTA-Defizienz den Export von Triglyzeriden aus der Leber nicht zu beeinflussen. Es reguliert auch nicht die endogene Lipidsynthese. Da auch die Menge der aufgenommenen Nahrung zwischen den Genotypen vergleichbar war, ist dies nicht Ursache für die fehlende Leberverfettung durch die Hochfettdiät. Somit könnte die verbesserte Aufnahme von Triglyzeriden in die Fettzellen [169] und auch eine vermehrte Ausscheidung der Lipide über den Kot als Erklärung herangezogen werden.

Der Immunzellrezeptor CLEC2H ist am zellulären Abwehrmechanismus beteiligt [201] und, im Vergleich zum Wildtyp, signifikant niedriger exprimiert in der Leber von SNTA -/- Mäusen auf Hochfettdiät. Dies bestätigt wiederum eine geringere inflammatorische Reaktion in den Knockout-Tieren. Bei der MCD-Diät dagegen zeigten sich genotypspezifisch keine signifikanten Unterschiede. Wohl aber bei den Tieren nach Fütterung der Paigendiät: Hier konnte eine signifikant niedrigere Expression von CLEC2H bei den SNTA -/- Tieren im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. CLEC2H wird in der Leber, in dendritischen Zellen und in Blutplättchen exprimiert und ist hauptsächlich wegen seiner Funktion als Rezeptor des Schlangengifts Rhodocytin erforscht [233]. Die Funktion in der Leber ist noch weitgehend unbekannt, wodurch keine weitere Aussage über die pathophysiologische Bedeutung in der NASH getroffen werden kann.

CYP4A12A wandelt die mehrfach ungesättigte Omega-3 Fettsäure Eicosapentaensäure in sein biologisch aktives Derivat um [234-236]. Den Omega-3 Fettsäuren werden viele positive Effekte, wie die Verbesserung der Dyslipidämie oder der Schutz vor

Entzündungen, zugesprochen. Diese sollte sich auch protektiv auf die Pathogenese der NAFLD auswirken. Ein hoher Gehalt an Eicosapentaensäure findet sich in fettreichen Seefischen, wie dem Lachs oder dem Hering [235]. Im Tiermodell der NAFLD könnte somit die erniedrigte Expression von CYP4A12A bei den Wildtyp-Tieren auf Hochfettdiät zur Entzündung in der Fettleber beitragen. Im Gegensatz dazu wurde bei den SNTA-Knockout-Mäusen keine reduzierte Expression detektiert.

Auch die Funktion von HSD3B5 ist noch weitgehend unbekannt. Es katalysiert die Inaktivierung von Ketosteroiden, eine Untergruppe der Steroidhormone, und ist ausschließlich bei den SNTA -/- Tieren auf Hochfettdiät signifikant erhöht [203].

Der Oligopeptidtransporter SLC15A5 war sowohl auf Standarddiät, als auch auf Hochfettdiät in den Knockout-Mäusen signifikant reduziert exprimiert. Dasselbe galt auch für die MCDK-Diät, die Kontrolldiät der Paigendiät und die Paigendiät selbst. Die Funktion von SLC15A5 ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht genauer untersucht. SLC15A3 und SLC15A4, die eine enge Verwandtschaft zu SLC15A5 aufweisen, sind für den Transport von Muramyl-dipeptid, einem Bestandteil der Peptidoglykane der Zellwand vieler Bakterien, aus dem Endolysosom verantwortlich [205]. Muramyl-dipeptid ist ein Ligand für den zytosolischen Rezeptor NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*), welcher in der Immunabwehr eine tragende Rolle spielt. Durch die Bindung des Muramyl-dipeptids an NOD2 wird eine proinflammatorische Immunantwort ausgelöst [237]. In den SNTA-Knockout-Tieren könnte also durch eine niedrigere Expression von SLC15A5 und der damit verbundenen reduzierten Bereitstellung des NOD2 Liganden der inflammatorische Signalweg weniger stark aktiviert und die Entzündung dadurch abgeschwächt werden.

4.3.2 TUBA8

Ein weiteres, wenig untersuchtes Gen, welches in den SNTA -/- Mäusen differenziell exprimiert war, ist TUBA8. TUBA8 ist Mitglied der Tubulin-Familie, beeinflusst die Zellproliferation sowie Migration und ist im murinen HCC um das etwa 100-fache erhöht [208]. Es ist in der Leber und im weißen Fettgewebe ähnlich hoch exprimiert -im Vergleich zum Skelettmuskel und dem braunen Fettgewebe aber eher gering. Die starke Expression im Skelettmuskel und dem braunen Fettgewebe könnte aufgrund ihrer Abstammung von gemeinsamen Vorläuferzelle erklärt werden [238]. Zusätzlich ist auch eine Expression von TUBA8 im Herzen, im Skelettmuskel und den Hoden sowie eine schwächere Expression im Gehirn und dem Pankreas beschrieben [207].

4.3.2.1 TUBA8 ist in der NAFLD und im SNTA-Knockout differenziell exprimiert

Die Analysen der TUBA8-Expression in der Pathogenese der NAFLD zeigte eine diätspezifische, wie auch genotypspezifische differenzielle Expression.

Bei dem Tiermodell der Hochfettdiät ergaben die mRNA- und Proteinanalyse unterschiedliche Resultate. Die TUBA8-mRNA-Expression war bei den SNTA $-/-$ Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren auf Hochfettdiät reduziert. Im Gegensatz dazu wurde die Protein-Expression als unverändert festgestellt. Letzteres Ergebnis wurde mit Hilfe eines weiteren, kommerziell erworbenen TUBA8 Antikörpers, welcher an ein anderes Epitop des Proteins bindet, verifiziert. Unterschiede in der Expression der mRNA und des jeweiligen Proteins sind keineswegs ungewöhnlich. Hier spielen unterschiedliche Synthese- und Abbauraten sowie posttranskriptionelle Mechanismen eine Rolle. Daher sollte neben der mRNA-Expression vor allem bei weniger gut untersuchten Genen auch die Protein-Expression analysiert werden.

In dem NASH-induzierenden Tiermodell der Paigendiät zeigte sich auf Proteinebene in den SNTA $-/-$, wie auch den Wildtyp-Mäusen, im Gegensatz zur MCD-Diät, keine signifikant höhere TUBA8-Expression in den NASH Lebern. Durch eine atherogene Paigendiät entwickeln die Mäuse innerhalb eines längeren Zeitraums eine NASH [154, 155], wohingegen die MCD-Diät innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums ähnliche molekulare Auswirkungen hat [152, 153]. Ein Grund für die erhöhte Expression von TUBA8 durch die MCD-Diät -jedoch nicht in der Paigendiät- könnte also das Stadium der Pathogenese der NASH sein. Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Diäten liegt bei der Entwicklung der Fibrose. Während sich die Fibrose bei der MCD-Diät histologisch in der Leber noch nicht ausgeprägt hatte, waren bei der Paigendiät die Kollagenfasern sichtbar vermehrt.

Die bis jetzt bekannten Studien zur Funktion von TUBA8 gehen alle auf Kamino *et al.* zurück [208]. Dabei wurde TUBA8, ähnlich wie in dieser Arbeit, über einen DNA-Microarray in CAR $-/-$ Mäusen als differenziell exprimiert entdeckt. Der *nuclear constitutive active/androstane receptor* CAR ist Mitglied der *thyroid/steroid hormone nuclear receptor* Familie und als Kernrezeptor wichtig für die Detoxifizierung von Medikamenten in der Leber [239, 240]. Zusätzlich spielt CAR auch eine Rolle im NASH Metabolismus. CAR $-/-$ Mäuse entwickeln bei Fütterung einer NASH-induzierenden MCD-Diät ausschließlich eine Steatose – hepatischer oxidativer Stress und die damit einhergehende Entzündung sind nur schwach ausgeprägt [241]. Diese Effekte traten auch bei den SNTA $-/-$ Mäusen auf MCD-Diät auf. Auch hier entstand ausschließlich eine Steatose. Die Entzündung, der

oxidative Stress und die beginnende Fibrose wurden nicht induziert. Eventuell könnte TUBA8 die entscheidende Verbindung für das Auslösen dieser Effekte sein.

In vitro Experimente, bei denen sowohl ein Knockdown als auch eine Überexpression von TUBA8 generiert wurde bestätigen die *in vivo* Ergebnisse und zeigten, dass SNTA einen direkten Einfluss auf die TUBA8 Proteinmenge ausübt.

4.3.2.2 Expression und Lokalisation von TUBA8 in hepatischen Sternzellen

Da die Fibrose aufgrund der Aktivierung und Vermehrung von hepatischen Sternzellen, welche vermehrt Kollagen in die Leber einlagern, entsteht, wurde die Expression von TUBA8 in diesen Zellen untersucht. Dabei zeigte sich in primären humanen Sternzellen eine sehr starke Expression. Im Gegensatz dazu konnte in primären humanen Hepatozyten keine Expression detektiert werden. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass TUBA8 eine Rolle in der Fibrogenese spielen könnte. Des Weiteren wurde die Expression von TUBA8 in den hepatischen Sternzellen durch eine immunhistochemische Färbung und eine immunfluoreszente Doppelfärbung bestätigt. Hierbei zeigte sich eine Kolokalisation zwischen dem Sternzellmarker Desmin und TUBA8. Desmin ist ein Intermediärfilamentprotein und Bestandteil des Zytoskeletts [242]. Die starke Expression von TUBA8 in hepatischen Sternzellen und die Kolokalisation mit Desmin könnte einen Einfluss dieses Tubulins für das Zytoskelett bedeuten.

4.3.2.3 Expression von TUBA8 in verschiedenen hepatischen Zelllinien

Zusätzlich zur Analyse der TUBA8-Expression in primären humanen Hepatozyten wurden diese auch in verschiedenen hepatischen Zelllinien überprüft. Dabei zeigte sich eine starke TUBA8-Protein-Expression in den Hepatozyten Zelllinien PLC, Hep3B, HepG2 und Huh7. In der Publikation von Kamino *et al.* wurde bereits eine hohe mRNA-Expression von TUBA8 in HepG2 und Huh7 Zellen beschrieben [208]. Diese starke Induktion von TUBA8 in transformierten Hepatozyten spricht für eine Beteiligung der transformierten parenchymalen Zellen an der erhöhten Expression von TUBA8 im HCC [208] und eine mögliche Funktion des Tubulins in der Hepatokarzinogenese. Zusätzlich konnte TUBA8 auch in der Sternzellen Zelllinie LX-2 und der Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 detektiert werden. Da die Expression von TUBA8 in allen untersuchten Zelllinien relativ hoch war, könnte eine Induktion in den Tumorzellen nicht nur auf die Hepatozyten beschränkt sein. Einen weiteren Beitrag zur erhöhten TUBA8-Expression im HCC könnten die hepatischen

Sternzellen liefern, welche an der Tumorentstehung und -entwicklung beteiligt sind [243]. Die Überexpression von TUBA8 stört die Zellproliferation und das Zellwachstum in Huh7 Zellen, wohingegen die Zellmigration in HepG2 Zellen aktiviert wird [208]. Da die erzielten Ergebnisse in der jeweiligen anderen Zelllinie nicht reproduziert werden konnten zeigt, dass TUBA8 unterschiedliche Funktionen in den beiden Hepatozytenzelllinien ausübt. [208]. Andere Proteine, die, wie p53, in Huh7 Zellen verändert sind, könnten daher die Funktion von TUBA8 beeinflussen.

4.3.2.4 Expression von TUBA8 ist im humanen HCC erhöht

Die TUBA8-mRNA-Expression liegt im murinen HCC erhöht vor. In dieser Studie wurden die Lebertumore mittels des Barbiturates Phenobarbital induziert, wobei bereits 24 h nach Injektion die TUBA8-mRNA-Expression erhöht vorlag [208]. Dies lässt eine Rolle von TUBA8 in der Entstehung von Lebertumoren vermuten. Aber auch 32 Wochen nach der Phenobarbital und einer zusätzlichen Diethylnitrosamin Behandlung lag das TUBA8-Level in den Wildtyp-Mäusen, die Tumore entwickelt haben, erhöht vor. Im Vergleich vom entstandenen Tumorgewebe zum normalen Lebergewebe ließ sich eine 100-fache Erhöhung der TUBA8-Expression feststellen [208]. Dies zeigt, dass TUBA8 nicht nur bei der Entstehung von hepatischen Karzinomen eine Rolle spielt, sondern möglicherweise auch beim Fortschreiten der Erkrankung.

Im humanen HCC wurde in dieser Arbeit eine signifikant höhere TUBA8-Protein-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Nicht-Tumorgewebe desselben Spenders festgestellt. Da weitere Studien ebenfalls eine erhöhte Expression von TUBA1B und TUBA6 im humanen HCC zeigen [244, 245], scheint eine Erhöhung der Tubuline im HCC nicht speziell für TUBA8 zu gelten. Das erhöhte TUBA1B-Level geht mit der Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel und einer geringeren Überlebenschance einher [245].

Bei einem HCC ist ein wichtiger Aspekt für eine gute Überlebenschance die möglichst frühe Erkennung der Erkrankung. Da Lebererkrankungen lange Zeit asymptomatisch ablaufen, stellt die Diagnose oft eine Schwierigkeit dar. Im Vergleich der TUBA8-Expression mit dem Staging oder Grading des HCCs zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse, wodurch der Nachweis von TUBA8 nicht für diagnostische oder prognostische Aussagen geeignet ist. Der limitierende Faktor, der die Aussagekraft dieses Ergebnisses einschränkt, ist die geringe Größe des untersuchten Kollektivs. Die Ergebnisse sollten in einem großen Kollektiv noch einmal überprüft werden.

4.3.2.5 TUBA8 als neuer Interaktionspartner von SNTA

Aufgrund seiner Rolle als Adapterprotein muss die Funktion von SNTA im Zusammenhang mit den Interaktionspartnern geklärt werden [149]. Wegen einer differenziellen Expression von SNTA bzw. der jeweiligen Bindungspartner in verschiedenen Zellen bzw. Geweben ist es möglich, dass der biologische Effekt dieses Proteins variiert. Daher ist für die Analyse der Funktion von SNTA die Identifizierung von Interaktionspartnern nötig. Mit Hilfe von Präzipitationsexperimenten konnte TUBA8 als möglicher, bisher nicht beschriebener Interaktionspartner von SNTA identifiziert werden.

TUBA8 ist in seiner Struktur mit 11 % Differenz am unterschiedlichsten zu allen anderen α -Tubulinen. Da diese Unterschiede, die sich vor allem N- und C-terminal befinden, sowohl im murinen als auch im humanen TUBA8 vorhanden sind, lässt sich eine Funktionalität vermuten [207]. C-terminale Varianten machen die verschiedenen Isotyp Formen der α -Tubuline aus [246-248]. Die N-terminalen Eigenheiten von TUBA8 sind dagegen unter den α -Tubulinen einzigartige Besonderheiten. Diese Region ist in der inneren Oberfläche des Hohlzylinders des Mikrotubulus lokalisiert und an der Interaktion zwischen einzelnen Protofilamenten beteiligt [249]. Dieser Bereich ist normalerweise bei allen α -Tubulinen identisch – außer bei TUBA8. Diese ersten Erkenntnisse zur Funktion von TUBA8 sprechen, obwohl die Struktur eine große Divergenz zu anderen Tubulinen aufweist, wiederum für eine Rolle im Zytoskelett und damit für eine Verbindung zu den Syntrophinen.

Das überexprimierte SNTA zeigte eine Interaktion mit dem endogenen TUBA8. Es sollten aber zusätzlich zur Präzipitation Kolokalisationsfärbungen die Interaktion zwischen TUBA8 und SNTA bestätigen. Da beide Proteine im Zytoskelettkomplex verankert sind, besteht die Möglichkeit, dass diese Verbindung während der Lyse nicht getrennt werden konnte und somit das Ergebnis als falsch-positiv gewertet werden müsste. Dafür spricht auch die bei der Präzipitation angezeigte Interaktion zwischen SNTB2 und TUBA8. TUBA8 zeigte weder *in vivo*, noch *in vitro* eine differenzielle Expression bei einem Knockout oder einer Überexpression von SNTB2. Die hier gezeigte Interaktion zwischen SNTA und SNTB2 bestätigt vorangegangene Studien. Die meisten Syntrophin Isoformen treten teils als Monomere oder als Dimere auf und können mit anderen Isoformen eine Bindung eingehen [149]. Die nicht vorhandene Interaktion zwischen dem exogenen TUBA8 und dem endogenen SNTA könnte an der geringeren Überexpression des exogenen TUBA8 liegen.

Die Ergebnisse zeigten, dass SNTA die Protein-Expression von TUBA8 beeinflussen kann. Dies könnte für die Funktion von hepatischen Sternzellen, für die NASH und auch für das HCC von Bedeutung sein.

5 Zusammen- fassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle von α -Syntrophin (SNTA) und β 2-Syntrophin (SNTB2) in der nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) untersucht. Die NASH ist die progrediente Ausprägung der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD), welche die häufigste Ursache für Lebererkrankungen darstellt. Sie entwickelt sich in der verfetteten Leber und kann zur Leberzirrhose und / oder einem hepatozellulären Karzinom (HCC) führen.

Die Syntrophine sind bislang hauptsächlich im Muskel untersucht, da sie Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes sind. Vorarbeiten zeigen, dass die Syntrophine verschiedene Proteine mit einer Rolle im Fettstoffwechsel, wie ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), Caveolin-1 oder SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*) beeinflussen. ABCA1 ist ein essentielles Protein im reversen Cholesterintransport und wird über die Bindung zu SNTA stabilisiert [135, 136]. Caveolin-1 ist Bestandteil der sogenannten Caveolae, die für die Signaltransduktion verschiedenster Proteine von Bedeutung sind [150]. In SNTB2 -/- Mäusen ist Caveolin-1 in der Leber erhöht exprimiert (Promotion Dr. Sabrina Krautbauer). SCD1 führt eine Doppelbindung in gesättigte Fettsäuren ein und ist somit für die Synthese einfach ungesättigter Fettsäuren wichtig [250]. In der Leber von SNTA -/- Mäusen liegt die Expression von SCD1 erhöht vor (Promotion Dr. Kristina Eisinger).

Zur Analyse der Rolle der Syntrophine wurde die Expression von SNTA sowohl in der Leber von NAFLD-Patienten als auch in murinen NAFLD-Modellen untersucht.

Human zeigte sich dabei eine erniedrigte SNTA-mRNA-Expression bei NAFLD-Patienten mit einer fortgeschrittenen NASH. Bestätigt wurde dies aufgrund einer negativen Korrelation des SNTA-Levels mit dem Steatosegrad, dem Entzündungsgrad, dem Fibrosegrad und somit auch mit dem aus diesen Parametern resultierenden NASH-Score. Auch nach Ausschluss der Typ-2-Diabetes-Patienten aus der Kohorte waren diese Korrelationen signifikant. Dabei stellt Typ-2-Diabetes einen Risikofaktor und dadurch eine häufige Komorbidität in der NAFLD dar. Zusätzlich lag in der untersuchten NAFLD-Kohorte eine positive Korrelation von SNTA mit SR-BI (*scavenger receptor-BI*), ein wichtiger Akteur im reversen Cholesterintransport, vor. Im HCC wies die SNTA-Protein-Expression dagegen keine Assoziation zu der Erkrankung auf.

Zur Untersuchung der Rolle der Syntrophine in der murinen NASH wurden zwei verschiedene, häufig für präklinische Studien eingesetzte NASH-Diätmodelle, angewandt. Die Methionin- und Cholin-defiziente (MCD)-Diät und die atherogene Paigendiät. Dabei zeigte sich, dass der Knockout von SNTA die Mäuse vor einer MCD-Diät-induzierten NASH schützt. Es entwickelte sich zwar eine Steatose, es konnten aber im Gegensatz zu

den Wildtyp-Tieren keine für die NASH typischen Ausprägungen festgestellt werden. Die Expression verschiedener Entzündungsmarker, wie auch von Malondialdehyd, einem Marker für oxidativen Stress, war in der Leber der SNTA $-/-$ Tiere auf MCD-Diät nicht erhöht. Auch die Fettsäuresynthese, welche bei der MCD NASH vermindert wird, wurde bei den Knockout-Tieren weniger stark supprimiert. Vor dem Gewichtsverlust, welcher durch die MCD-Diät induziert wird, konnte die SNTA-Defizienz die Mäuse ebenfalls schützen. Diese protektiven Effekte des SNTA-Knockouts in der MCD-Diät-induzierten NASH konnten in der atherogenen Paigendiät nicht nachgewiesen werden. Hier war lediglich der oxidative Stress bei den SNTA-defizienten-Mäusen in der Paigendiät-induzierten NASH nicht erhöht. Die Entstehung der Steatose, der Entzündung sowie auch der Fibrose in der Leber konnte durch den Knockout nicht verhindert werden.

Die Defizienz der verwandten Syntrophin Isoform SNTB2 zeigte keine protektiven Effekte in der NASH. SNTB2 $-/-$ Mäuse auf MCD-Diät entwickeln, wie auch die Kontroll-Wildtyp-Tiere, eine NASH, welche mit Steatose, Entzündung und Fibrose einhergeht. Dies zeigt, dass die verschiedenen Syntrophin Isoformen in der Leber und womöglich auch in der Pathogenese der NASH unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

Um die Lebersteatose als ein Spektrum der NAFLD zu untersuchen, wurden SNTA $-/-$ Mäuse und die entsprechenden Wildtyp-Kontrollen auf eine Hochfettdiät gesetzt. Dabei wurde die Insulinsensitivität, welche in der Entwicklung der NAFLD eine große Rolle spielt, analysiert. Es stellte sich heraus, dass die SNTA-Defizienz die Mäuse vor einer Hochfettdiät-induzierten Insulinresistenz in der Leber und im subkutanen Fett schützt.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit verschiedene, bei einer SNTA-Defizienz differenziell exprimierte Gene, in der NAFLD untersucht. TUBA8 (*tubulin alpha 8*) wurde dabei als Bestandteil des Zytoskeletts näher analysiert. Da SNTA an Aktin bindet und ebenfalls das Zytoskelett beeinflusst wurde ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen vermutet. Dabei stellte sich heraus, dass TUBA8 vor allem in hepatischen Sternzellen wie auch in transformierten Hepatozyten exprimiert ist. Eine in der Literatur beschriebene erhöhte Expression von TUBA8 im murinen HCC konnte in humanen Geweben bestätigt werden. Durch die SNTA-Defizienz konnte sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* eine erhöhte TUBA8-Protein-Expression detektiert werden. Zusätzlich wurden erste Hinweise auf eine Interaktion von TUBA8 und SNTA erzielt. Da Syntrophine als Adapterproteine ihre Funktion über die Lokalisation und Stabilisierung verschiedener Interaktionspartner ausüben, könnte der SNTA-TUBA8-Komplex für die Pathogenese der NASH eine Rolle spielen.

6 Anhang

6.1 Publikationen

6.1.1 Erstautorenschaften

Rein-Fischboeck L, Pohl R, Haberl EM, Weiss TS, Buechler C. The adaptor protein alpha-syntrophin is reduced in human non-alcoholic steatohepatitis but is unchanged in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2017 Sep 19.

Rein-Fischboeck L, Pohl R, Haberl EM, Zimny S, Neumann M, Eisinger K, Weiss TS, Krautbauer S, Buechler C. Tubulin alpha 8 is expressed in hepatic stellate cells and is induced in transformed hepatocytes. *Mol Cell Biochem*. 2017 Apr; 428(1-2):161-170. doi: 10.1007/s11010-016-2926-4. Epub 2017 Jan 7.

Rein-Fischboeck L, Krautbauer S, Eisinger K, Pohl R, Meier EM, Weiss TS, Buechler C. Hepatic scavenger receptor BI is associated with type 2 diabetes but unrelated to human and murine non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Nov 13; 467(2):377-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.149. Epub 2015 Sep 30.

6.1.2 Koautorenschaften

Krautbauer S, **Rein-Fischboeck L**, Haberl EM, Pohl R, Wiest R, Buechler C. Circulating fibroblast growth factor 21 in patients with liver cirrhosis. *Clin Exp Med*. 2017 Jul 25. doi: 10.1007/s10238-017-0468-z.

Buechler C, Haberl EM, **Rein-Fischboeck L**, Aslanidis C. Adipokines in Liver Cirrhosis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 29; 18(7). pii: E1392. doi: 10.3390/ijms18071392.

Zimny S, Pohl R, **Rein-Fischboeck L**, Haberl EM, Krautbauer S, Weiss TS, Buechler C. Chemokine (CC-motif) receptor-like 2 mRNA is expressed in hepatic stellate cells and is positively associated with characteristics of non-alcoholic steatohepatitis in mice and men. *Exp Mol Pathol*. 2017 Jun 15;103(1):1-8. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.06.001.

Pohl R, Haberl EM, **Rein-Fischboeck L**, Zimny S, Neumann M, Aslanidis C, Schacherer D, Krautbauer S, Eisinger K, Weiss TS, Buechler C. Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis. *Eur J Clin Invest*. 2017 Jan;47(1):7-18. doi: 10.1111/eci.12695. Epub 2016 Nov 21.

Krautbauer S, Haberl EM, Eisinger K, Pohl R, **Rein-Fischboeck L**, Rentero C, Alvarez-Guaita A, Enrich C, Grewal T, Buechler C, Neumeier M. Annexin A6 regulates adipocyte

lipid storage and adiponectin release. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Jan 5; 439:419-430. doi: 10.1016/j.mce.2016.09.033. Epub 2016 Oct 1.

Krautbauer S, Meier EM, **Rein-Fischboeck L**, Pohl R, Weiss TS, Sigrüener A, Aslanidis C, Liebisch G, Buechler C. Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Nov; 1861(11):1767-1774. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.014. Epub 2016 Aug 26.

Neumann M, Meier EM, **Rein-Fischboeck L**, Krautbauer S, Eisinger K, Aslanidis C, Pohl R, Weiss TS, Buechler C. Chemokine-Like Receptor 1 mRNA Weakly Correlates with Non-Alcoholic Steatohepatitis Score in Male but Not Female Individuals. *Int J Mol Sci*. 2016 Aug 18; 17(8). pii: E1335. doi: 10.3390/ijms17081335.

Meier EM, **Rein-Fischboeck L**, Pohl R, Wanninger J, Hoy AJ, Grewal T, Eisinger K, Krautbauer S, Liebisch G, Weiss TS, Buechler C. Annexin A6 protein is downregulated in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem*. 2016 Jul; 418(1-2):81-90. doi: 10.1007/s11010-016-2735-9. Epub 2016 Jun 23.

Meier EM, Pohl R, **Rein-Fischboeck L**, Schacherer D, Eisinger K, Wiest R, Krautbauer S, Buechler C. Circulating lipocalin 2 is neither related to liver steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease nor to residual liver function in cirrhosis. *Cytokine*. 2016 Sep; 85:45-50. doi: 10.1016/j.cyto.2016.06.004. Epub 2016 Jun 9.

Eisinger K, **Rein-Fischboeck L**, Pohl R, Meier EM, Krautbauer S, Buechler C. The adaptor protein alpha-syntrophin regulates adipocyte lipid droplet growth. *Exp Cell Res*. 2016 Jul 1; 345(1):100-7. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.05.020. Epub 2016 May 27.

Pohl R, **Rein-Fischboeck L**, Meier EM, Eisinger K, Krautbauer S, Buechler C. Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis. *Exp Mol Pathol*. 2015 Apr; 98(2):295-9. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.02.005. Epub 2015 Feb 12.

Hebel T, Eisinger K, Neumeier M, **Rein-Fischboeck L**, Pohl R1, Meier EM, Boettcher A, Froehner SC, Adams ME, Liebisch G, Krautbauer S, Buechler C. Lipid abnormalities in alpha/beta2-syntrophin null mice are independent from ABCA1. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May; 1851(5):527-36. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.01.012. Epub 2015 Jan 24.

Wanninger J, Liebisch G, Eisinger K, Neumeier M, Aslanidis C, **Voggenreiter L**, Pohl R, Weiss TS, Krautbauer S, Buechler C. Adiponectin isoforms differentially affect gene expression and the lipidome of primary human hepatocytes. *Metabolites*. 2014 May 23; 4(2):394-407. doi: 10.3390/metabo4020394.

6.2 Kongressbeiträge

6.2.1 Vorträge

Rein-Fischboeck L, et al. Role of alpha and beta 2 Syntrophin in Non-alcoholic Steatohepatitis. - Summer School of the RIGeL BIOMED Section, Nürnberg, 13.10.-15.10.2016

6.2.2 Poster

Rein-Fischboeck L, et al. Tubulin alpha 8 is expressed in hepatic stellate cells and is induced in transformed hepatocytes. - 39th European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 0.09.-08.09.2016

Voggenreiter L, et al. Role of alpha and beta 2 Syntrophin in Non-alcoholic Steatohepatitis. - Summer School of the RIGeL BIOMED Section, Regen, 26.09.-27.09.2014

Voggenreiter L, et al. Adiponectin isoforms differentially affect gene expression and lipidome of primary human hepatocytes. Healthcare integrated biobanking and multiomics biomarker analysis. - Healthcare integrated biobanking and multiomics biomarker analysis – International conference, Regensburg, 03.07.-05.07.2014

6.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Spektrum der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) (nach [24-26])..... | 13 |
| Abbildung 2: NAFLD-Pathogenese nach der <i>multiple-hit</i> Hypothese (nach [26, 29])..... | 18 |
| Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Syntrophine mit ihren Interaktionspartnern (nach [149]). | 25 |
| Abbildung 4: Enzymatischer Prozess der Triglyzeridmessung. | 70 |
| Abbildung 5: Hepatische SNTA-mRNA-Expression der NAFLD-Kohorte in Bezug auf verschiedene Parameter.. | 77 |
| Abbildung 6: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte in Bezug auf Parameter der NASH. | 78 |
| Abbildung 7: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte bei Hypertension- und Typ-2-Diabetes-Patienten. | 79 |
| Abbildung 8: NASH-Score und NASH-Charakteristika in der NAFLD-Kohorte im Verhältnis zu Typ-2-Diabetes. | 80 |
| Abbildung 9: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte in Bezug auf Parameter der NASH unter Ausschluss von Typ-2-Diabetes-Patienten..... | 81 |
| Abbildung 10: Hepatische SR-BI-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte..... | 82 |
| Abbildung 11: Hepatische SNTA-mRNA-Expression in der NAFLD-Kohorte in Bezug auf die SR-BI- und die MnSOD-mRNA-Expression. | 83 |
| Abbildung 12: SNTA-Protein-Expression im humanen HCC. | 84 |
| Abbildung 13: Hepatische SNTA-mRNA- und-Protein-Expression in der murinen NASH nach zwei-wöchiger Methionin-Cholin-defizienter Kontroll (MCDK)- und Methionin-Cholin-defizienter (MCD)-Diät bzw. zwölf-wöchiger Kontrolldiät und Paigendiät..... | 86 |
| Abbildung 14: Körpergewichte und Gewichte verschiedener Gewebe von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 88 |
| Abbildung 15: Adipokine von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 89 |
| Abbildung 16: Lebersteatose von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 90 |
| Abbildung 17: Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 92 |
| Abbildung 18: Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 93 |
| Abbildung 19: Hepatische Expression von Makrophagengenen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 94 |
| Abbildung 20: Hepatische Expression von Lymphozytengenen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 95 |
| Abbildung 21: Hepatische Fibrose von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 97 |
| Abbildung 22: Hepatische Expression von SMAD3, c-JUN und JNK in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 98 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 23: Hepatischer Oxidativer Stress von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 99 |
| Abbildung 24: Körpergewichte und Gewichte verschiedener Gewebe von Wildtyp (WT)- und SNTB2 -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 100 |
| Abbildung 25: Hepatische Expression von Makrophagengenen in Wildtyp (WT)- und SNTB2 -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 101 |
| Abbildung 26: Hepatische Fibrose von Wildtyp (WT)- und SNTB2 -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 102 |
| Abbildung 27: Hepatischer Oxidativer Stress von Wildtyp (WT)- und SNTB2 -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 102 |
| Abbildung 28: Fettgewebegewichte, Körpergewicht und Adipokine von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. | 104 |
| Abbildung 29: Lebersteatose von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. | 105 |
| Abbildung 30: Hepatische Expression von an der Fettsäuresynthese beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. | 106 |
| Abbildung 31: Hepatische Expression von am Cholesterinmetabolismus beteiligten Proteinen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. | 107 |
| Abbildung 32: Hepatische Expression von Makrophagen- und Lymphozytengenen in Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. ... | 108 |
| Abbildung 33: Hepatische Fibrose von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. | 109 |
| Abbildung 34: Hepatischer Oxidativer Stress von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. | 110 |
| Abbildung 35: Insulin Response in der Leber und dem subkutanen Fett von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- und der Hochfettdiät. | 111 |
| Abbildung 36: Insulin Response in dem epididymalen und dem perirenenalen Fett von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- und der Hochfettdiät. | 112 |
| Abbildung 37: Differenziell exprimierte Gene von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- und der Hochfettdiät in der Leber. | 115 |
| Abbildung 38: Differenziell exprimierte Gene in der Leber von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 116 |
| Abbildung 39: Differenziell exprimierte Gene in den Lebern von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und der Paigendiät. | 117 |
| Abbildung 40: Differenziell exprimierte Gene in mit SNTA siRNA behandelten Hepa1-6 Zellen. | 117 |
| Abbildung 41: TUBA8-Expression in verschiedenen murinen Geweben. | 119 |
| Abbildung 42: Expression von TUBA8 in verschiedenen primären Zellen und Zelllinien. | 120 |
| Abbildung 43: Zelluläre Lokalisation von TUBA8 in der murinen Leber. A Immunhistochemische Färbung von TUBA8. B Immunfluoreszente Doppelfärbung von Desmin und TUBA8. | 121 |
| Abbildung 44: TUBA8-Protein-Expression im humanen HCC. | 122 |
| Abbildung 45: Hepatische TUBA8-Expression von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach 14-wöchiger Fütterung der Standard- (SD) und der Hochfettdiät (HFD). | 124 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 46: Hepatische TUBA8-Expression von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwei-wöchiger Fütterung der Methionin-Cholin-defizienten Kontroll (MCDK)- und der Methionin-Cholin-defizienten (MCD)-Diät. | 125 |
| Abbildung 47: Hepatische TUBA8-Expression von Wildtyp (WT)- und SNTA -/- Mäusen nach zwölf-wöchiger Fütterung der Kontroll- und Paigendiät. | 125 |
| Abbildung 48: TUBA8-Expression in Hepa1-6 Zellen mit herunterregulierter SNTA-Expression mittels siRNA. | 126 |
| Abbildung 49: TUBA8 und α -Tubulin in Hepa1-6 Zellen, die ein SNTA HaloTag Fusionsprotein (pHTN+SNTA) überexprimieren. | 127 |
| Abbildung 50: Interaktionen in Hepa1-6 Zellen, die ein SNTA, SNTB2 oder ein TUBA8 HaloTag Fusionsprotein (pHTN+SNTA, +SNTB2, +TUBA8) überexprimieren. | 128 |

6.4 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte. | 29 |
| Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien. | 31 |
| Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien. | 34 |
| Tabelle 4: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Arbeiten mit DNA. | 34 |
| Tabelle 5: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Extraktion von Proteinen. | 35 |
| Tabelle 6: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE. | 35 |
| Tabelle 7: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für das Western Blotting. | 36 |
| Tabelle 8: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Antigenspezifische Färbung. | 36 |
| Tabelle 9: Liste der verwendeten Lösungen für die Färbung aller Proteine. | 36 |
| Tabelle 10: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für den ELISA. | 37 |
| Tabelle 11: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Sirius-Red-Färbung. | 37 |
| Tabelle 12: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die immunhistochemische Färbung. | 37 |
| Tabelle 13: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung. | 38 |
| Tabelle 14: Liste der verwendeten Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen. | 38 |
| Tabelle 15: Liste der verwendeten Medien und Lösungen zur Kultivierung und Selektion von prokaryotischen Zellen (<i>E. coli</i>). | 39 |
| Tabelle 16: Liste der verwendeten Enzyme. | 39 |
| Tabelle 17: Liste der verwendeten primären Antikörper. | 40 |
| Tabelle 18: Liste der verwendeten sekundären Antikörper. | 41 |
| Tabelle 19: Liste der verwendeten LightCycler® Primer für murine Gene. | 42 |
| Tabelle 20: Liste der verwendeten LightCycler® Primer für humane Gene. | 43 |
| Tabelle 21: Liste der verwendeten Primer für PCR. | 43 |
| Tabelle 22: Liste der verwendeten Primer für die Sequenzierung. | 44 |
| Tabelle 23: Liste der verwendeten siRNAs. | 44 |
| Tabelle 24: Liste der verwendeten Kitsysteme. | 45 |
| Tabelle 25: Liste der verwendeten Eukaryoten. | 45 |
| Tabelle 26: Liste der verwendeten Prokaryoten. | 46 |
| Tabelle 27: Charakteristika der NAFLD-Kohorte. | 47 |
| Tabelle 28: Charakteristika der HCC-Kohorte. | 48 |
| Tabelle 29: Zellzahl eukaryotischer Zellen je nach Zellart und Kulturgefäß. | 53 |
| Tabelle 30: Endo-Porter Transfektionsansatz für die RNA-Interferenz (für ein Well einer 6 Well-Platte). | 53 |
| Tabelle 31: Lipofectamine™ 3000 Reagent Transfektionsansatz (für ein Well einer 6 Well-Platte). | 54 |
| Tabelle 32: Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion mit der Q5-Polymerase. | 57 |
| Tabelle 33: Cyclerprogramm für die Polymerasekettenreaktion mit der Q5-Polymerase. | 58 |
| Tabelle 34: Ansatz für den Restriktionsverdau. | 59 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 35: Ansatz für die Ligation. | 60 |
| Tabelle 36: Ansatz für die Reverse Transkription. | 63 |
| Tabelle 37: Ansatz für die Real-Time Polymerasekettenreaktion. | 64 |
| Tabelle 38: Cyclerprogramm für die semiquantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion. | 64 |
| Tabelle 39: Absteigende Alkoholreihe für die Entparaffinierung und Rehydratisierung. | 71 |
| Tabelle 40: Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung. | 72 |

6.5 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| μ | mikro (10 ⁻⁶) |
| αSMA | <i>alpha-smooth muscle actin</i> |
| A | Ampere |
| ABCA1 | <i>ATP-binding cassette transporter A1</i> |
| abs. | absolut |
| <i>ad libitum</i> | nach Belieben |
| AH | arterieller Hypertonus |
| ALT | Alanin-Aminotransferase |
| AMV | Avian Myeloblastosis Virus |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AST | Aspartat-Aminotransferase |
| ATGL | <i>(adipose triglyceride lipase)</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAT | <i>brown adipose tissue</i> (braunes Fettgewebe) |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BMI | Body-Mass-Index [kg/m ²] |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CCL2 | <i>CC-chemokine ligand 2</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA) |
| CHOD | Cholesterinoxidase |
| CIDEA | <i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i> |
| CIDEC | <i>cell death-inducing DFFA-like effector c</i> |
| CLEC2H | <i>c-type lectin domain family 2h</i> |
| COL1A1 | <i>collagen 1a1</i> |
| Cp | <i>crossing point</i> |
| CT | Computertomographie |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| CTGF | <i>connective tissue growth factor</i> |
| CYP4A12A | <i>cytochrom 4a12a</i> |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid |
| Da | Dalton |
| ddH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DEGS | Deutsche Epidemiologische Gesundheitssurvey |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |

| | |
|-------------------|---|
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescence</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| Epi | epididymal |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| ERK1/2 | <i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i> |
| <i>et al.</i> | <i>et alia</i> (und andere) |
| FAS | <i>fatty acid synthase</i> |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum) |
| FFA | <i>free fatty acid</i> (freie Fettsäure) |
| FNH | fokale noduläre Hyperplasie |
| g | Gramm |
| GAPDH | <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> |
| Grb2 | growth factor receptor bound protein 2 |
| GSH | Antioxidans Glutathion |
| h | Stunde |
| HC | Hypercholesterinämie |
| HCC | hepatozelluläres Karzinom |
| HDL | <i>high-density lipoprotein</i> |
| HFD | Hochfettdiät |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase) |
| HSC | primäre humane hepatische Sternzellen |
| HSD3B5 | <i>hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase</i> |
| HSL | <i>hormone sensitive lipase</i> |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| <i>in vitro</i> | außerhalb des lebenden Organismus |
| <i>in vivo</i> | im lebenden Organismus |
| JNK | <i>c-jun N-terminal kinase</i> |
| k | kilo |
| l | Liter |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LDL | <i>low-density lipoprotein</i> |
| LE | <i>long exposure</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| Ly49C | <i>killer cell lectin-like receptor subfamily A</i> |
| m | milli- (10^{-3}) |
| M | Molar (mol/l) |
| MCD-Diät | Methionin-Cholin-defiziente Diät |
| MCDK-Diät | Methionin-Cholin-defiziente Kontroll Diät |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| MDA | Malondialdehyd |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute |
| MnSOD | <i>manganese-dependent superoxide dismutase</i> |
| mRNA | messenger RNA |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| n | nano- (10^{-9}) |
| NAFLD | <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung) |

| | |
|------------|---|
| NASH | <i>non-alcoholic steatohepatitis</i> (nicht-alkoholische Steatohepatitis) |
| NCR1 | <i>natural cytotoxicity triggering receptor 1</i> |
| nNOS | <i>neuronal nitric oxide synthase</i> |
| NOD2 | <i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i> |
| NT | Nicht-Tumorgewebe |
| N-terminal | Amino-terminal |
| OD | optische Dichte |
| p.A. | <i>pro analysi</i> (für die Analyse) |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PAP | 4-Aminophenazon |
| PBS | <i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung) |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| PDZ | <i>postsynaptic density protein-95/disc-large/zonula occludens-1-Domäne</i> |
| PDZK1 | <i>PDZ domain-containing scaffolding protein 1</i> |
| PH | <i>pleckstrin homology</i> -Domäne |
| PHH | primäre humane Hepatozyten |
| PNPLA3 | <i>patatin-like phospholipase 3</i> |
| PVDF | Polyvinylfluorid |
| Rac1 | <i>Rac family small GTPase 1</i> |
| Ren | perirenal |
| rev | <i>reverse</i> |
| RISC | <i>RNA induced silencing complex</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| Rpm | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| rRNA | ribosomale RNA |
| SAA2 | <i>serum amyloid a2</i> |
| SAM | S-Adenosylmethionin |
| Sc | subkutan |
| SCD1 | <i>stearoyl-CoA desaturase-1</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SE | <i>short exposure</i> |
| SIBO | <i>small intestinal bacterial overgrowth</i> |
| siRNA | <i>short interfering RNA</i> |
| Sk | Skelett |
| SLC15A5 | <i>solute carrier 15a5</i> |
| SNTA | α 1-Syntrophin |
| SNTB1 | β 1-Syntrophin |
| SNTB2 | β 2-Syntrophin |
| SNTG1 | γ 1-Syntrophin |
| SNTG2 | γ 2-Syntrophin |
| SR-BI | <i>scavenger receptor-BI</i> |
| SREBP1c | <i>sterol regulatory element-binding protein 1</i> |
| SU | <i>syntrophin unique</i> -Domäne |
| T | Tumorgewebe |
| T2D | Typ-2-Diabetes |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBA | Thiobarbitursäure |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung) |
| TBST | TBS mit Tween 20 |

| | |
|--------|--|
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TG | Triglyzeride |
| TGFβ | <i>transforming growth factor beta</i> |
| TIMP1 | <i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i> |
| TM6SF2 | <i>transmembrane 6 superfamily member 2</i> |
| TNFα | <i>tumor necrosis factor alpha</i> |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| TUBA8 | <i>tubulin alpha 8</i> |
| uni | <i>universe</i> |
| UPR | <i>unfolded protein response</i> |
| UV | Ultraviolet |
| V | Volt |
| VLDL | <i>Very-low-density lipoprotein</i> |
| WAT | <i>white adipose tissue</i> (weißes Fettgewebe) |
| WT | Wildtyp |
| x | -mal, -fach |
| YWHAZ | <i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i> |
| z. B. | zum Beispiel |

6.6 Literaturverzeichnis

1. Brauer, R.W., *Liver circulation and function*. Physiological reviews, 1963. **43**(1): p. 115-214.
2. Wilkinson, G.R. and D.G. Shand, *A physiological approach to hepatic drug clearance*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 1975. **18**(4): p. 377-390.
3. Salen, G. and S. Shefer, *Bile acid synthesis*. Annual review of physiology, 1983. **45**(1): p. 679-685.
4. Danielsson, H., *Mechanisms of bile acid biosynthesis*, in *The bile acids, chemistry, physiology, and metabolism* 1973, Springer. p. 1-32.
5. Boyer, J.L., *Bile formation and secretion*. Comprehensive physiology, 2013.
6. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. Journal of lipid research, 2009. **50**(10): p. 1955-1966.
7. Ballard, F., *The development of gluconeogenesis in rat liver. Controlling factors in the newborn*. Biochemical Journal, 1971. **124**(2): p. 265-274.
8. Hems, D.A., E.A. Rath, and T.R. Verrinder, *Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour cycle*. Biochemical Journal, 1975. **150**(2): p. 167-173.
9. Koo, S.-H., *Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis*. Clinical and molecular hepatology, 2013. **19**(3): p. 210.
10. Linazasoro, J.M., et al., *Regulation of cholesterol synthesis in the liver: the influence of dietary fats*. Journal of Experimental Medicine, 1958. **107**(6): p. 813-820.
11. Sweeney, J.P. and A.C. Marsh, *Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers*. The Journal of nutrition, 1973. **103**(1): p. 20-25.
12. Sturgeon, P. and A. Shoden, *Total liver storage iron in normal populations of the USA*. The American journal of clinical nutrition, 1971. **24**(4): p. 469-474.
13. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Comprehensive physiology, 2014.
14. Hers, H., *The control of glycogen metabolism in the liver*. Annual review of biochemistry, 1976. **45**(1): p. 167-190.
15. Rappaport, A., et al., *Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology*. The anatomical record, 1954. **119**(1): p. 11-33.
16. Couinaud, C., *Liver anatomy: portal (and suprahepatic) or biliary segmentation*. Digestive surgery, 1999. **16**(6): p. 459-467.

17. MacPhee, P., E. Schmidt, and A. Groom, *Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1992. **263**(1): p. G17-G23.
18. Cassiman, D., et al., *Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers*. Journal of hepatology, 2002. **36**(2): p. 200-209.
19. Senoo, H., et al., *Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative—past, present and future*. Cell biology international, 2010. **34**(12): p. 1247-1272.
20. Safadi, R. and S. Friedman, *Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation*. MedGenMed: Medscape general medicine, 2002. **4**(3): p. 27-27.
21. Younossi, Z.M., et al., *Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2011. **9**(6): p. 524-530. e1.
22. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome*. Hepatology, 2003. **37**(4): p. 917-923.
23. Peeters, A., et al., *Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis*. Annals of internal medicine, 2003. **138**(1): p. 24-32.
24. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. **332**(6037): p. 1519-1523.
25. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, *Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases*. World journal of gastroenterology: WJG, 2011. **17**(23): p. 2801.
26. Buzzetti, E., M. Pinzani, and E.A. Tsochatzis, *The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1038-1048.
27. Tsochatzis, E., et al., *Metabolic syndrome is associated with severe fibrosis in chronic viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis*. Alimentary pharmacology & therapeutics, 2008. **27**(1): p. 80-89.
28. Gößwald, A., et al., *DEGS: Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2012. **55**(6-7): p. 775-780.
29. Cusi, K., *Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications*. Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 711-725. e6.
30. Mehta, K., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants*. Nutrition reviews, 2002. **60**(9): p. 289-293.
31. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?*, 1998, Elsevier.
32. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis*. Hepatology, 2010. **52**(5): p. 1836-1846.
33. Hedekov, C.J., *Mechanism of glucose-induced insulin secretion*. Physiological reviews, 1980. **60**(2): p. 442-509.
34. Guo, X., et al., *Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012. **2**(4): p. 358-367.
35. Musso, G., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis versus steatosis: adipose tissue insulin resistance and dysfunctional response to fat ingestion predict liver injury and altered glucose and lipoprotein metabolism*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 933-942.
36. Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1183-1192.
37. Peverill, W., L.W. Powell, and R. Skoien, *Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(5): p. 8591-8638.
38. Begriche, K., et al., *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it*. Mitochondrion, 2006. **6**(1): p. 1-28.
39. Cichoż-Lach, H. and A. Michalak, *Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases*. World journal of gastroenterology: WJG, 2014. **20**(25): p. 8082.
40. Seki, S., et al., *In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases*. Journal of hepatology, 2002. **37**(1): p. 56-62.
41. Pessayre, D. and B. Fromenty, *NASH: a mitochondrial disease*. Journal of hepatology, 2005. **42**(6): p. 928-940.
42. Indo, H.P., et al., *Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage*. Mitochondrion, 2007. **7**(1): p. 106-118.

43. Haque, M., et al. *Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is associated with hepatocyte mitochondrial DNA depletion*. in *Hepatology*. 2002. WB SAUNDERS CO INDEPENDENCE SQUARE WEST CURTIS CENTER, STE 300, PHILADELPHIA, PA 19106-3399 USA.
44. Pérez-Carreras, M., et al., *Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2003. **38**(4): p. 999-1007.
45. Stärkel, P., et al., *Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor- β up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats*. *Journal of hepatology*, 2003. **39**(4): p. 538-546.
46. Paradies, G., et al., *Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2014. **20**(39): p. 14205.
47. Boden, G., *Obesity and free fatty acids*. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 2008. **37**(3): p. 635-646.
48. Stefan, N., K. Kantartzis, and H.-U. Häring, *Causes and metabolic consequences of fatty liver*. *Endocrine reviews*, 2008. **29**(7): p. 939-960.
49. Czech, M.P., et al., *Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage*. *Diabetologia*, 2013. **56**(5): p. 949-964.
50. Malhi, H. and G.J. Gores. *Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease*. in *Seminars in liver disease*. 2008. © Thieme Medical Publishers.
51. Fu, S., et al., *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*. *nature*, 2011. **473**(7348): p. 528.
52. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2007. **8**(7): p. 519.
53. Wang, M. and R.J. Kaufman, *The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development*. *Nature reviews. Cancer*, 2014. **14**(9): p. 581.
54. Puri, P., et al., *Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(2): p. 568-576.
55. Ibrahim, S.H., R. Kohli, and G.J. Gores, *Mechanisms of lipotoxicity in NAFLD and clinical implications*. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2011. **53**(2): p. 131.
56. Tsochatzis, E.A., G.V. Papatheodoridis, and A.J. Archimandritis, *Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy*. *Mediators of inflammation*, 2009. **2009**.
57. Kamada, Y., T. Takehara, and N. Hayashi, *Adipocytokines and liver disease*. *Journal of gastroenterology*, 2008. **43**(11): p. 811-822.
58. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease*. *Journal of lipid research*, 2007. **48**(9): p. 1905-1914.
59. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. *Physiological reviews*, 2010. **90**(3): p. 859-904.
60. Miele, L., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 2009. **49**(6): p. 1877-1887.
61. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. *Diabetes*, 2008. **57**(6): p. 1470-1481.
62. Sabaté, J.-M., et al., *High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis*. *Obesity surgery*, 2008. **18**(4): p. 371-377.
63. Fialho, A., et al., *Small Intestinal Bacterial Overgrowth Is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, 2016. **25**(2).
64. Bures, J., et al., *Small intestinal bacterial overgrowth syndrome*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2010. **16**(24): p. 2978.
65. Gasbarrini, A., et al., *Small intestinal bacterial overgrowth: diagnosis and treatment*. *Digestive Diseases*, 2007. **25**(3): p. 237-240.
66. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. *Science*, 2011. **334**(6052): p. 105-108.
67. Corbin, K.D. and S.H. Zeisel, *Choline metabolism provides novel insights into non-alcoholic fatty liver disease and its progression*. *Current opinion in gastroenterology*, 2012. **28**(2): p. 159.

68. Zeisel, S.H., J.S. Wishnok, and J. Blusztajn, *Formation of methylamines from ingested choline and lecithin*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1983. **225**(2): p. 320-324.
69. Spencer, M.D., et al., *Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 976-986.
70. Best, C. and M.E. Huntsman, *The effect of choline on the liver fat of rats in various states of nutrition*. The Journal of physiology, 1935. **83**(3): p. 255-274.
71. Anstee, Q.M., A.K. Daly, and C.P. Day, *Genetics of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease*. in *Seminars in liver disease*. 2011. © Thieme Medical Publishers.
72. Romeo, S., et al., *Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nature genetics, 2008. **40**(12): p. 1461-1465.
73. Anstee, Q.M. and C.P. Day, *The genetics of NAFLD*. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2013. **10**(11): p. 645-655.
74. He, S., et al., *A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(9): p. 6706-6715.
75. Liu, Y.-L., et al., *Carriage of the PNPLA3 rs738409 C> G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma*. Journal of hepatology, 2014. **61**(1): p. 75-81.
76. Sookoian, S., et al., *Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity*. Hepatology, 2015. **61**(2): p. 515-525.
77. Dongiovanni, P., et al., *Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease*. Hepatology, 2015. **61**(2): p. 506-514.
78. Kozlitina, J., et al., *Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease*. Nature genetics, 2014. **46**(4): p. 352-356.
79. Stengel, J.Z. and S.A. Harrison, *Nonalcoholic steatohepatitis: clinical presentation, diagnosis, and treatment*. Gastroenterology & hepatology, 2006. **2**(6): p. 440.
80. Powell, E.E., et al., *The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years*. Hepatology, 1990. **11**(1): p. 74-80.
81. Desmet, V.J., et al., *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1513-1520.
82. Machado, M.V. and H. Cortez-Pinto, *Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal*. Journal of hepatology, 2013. **58**(5): p. 1007-1019.
83. Sumida, Y., A. Nakajima, and Y. Itoh, *Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis*. World journal of gastroenterology: WJG, 2014. **20**(2): p. 475.
84. Saadeh, S., et al., *The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 745-750.
85. Gaia, S., et al., *Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis*. Journal of hepatology, 2011. **54**(1): p. 64-71.
86. Foucher, J., et al., *Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study*. Gut, 2006. **55**(3): p. 403-408.
87. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-1321.
88. Harrison, S.A. and C.P. Day, *Benefits of lifestyle modification in NAFLD*. Gut, 2007. **56**(12): p. 1760-1769.
89. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 2005-2023.
90. Promrat, K., et al., *Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 121-129.
91. Nseir, W., E. Hellou, and N. Assy, *Role of diet and lifestyle changes in nonalcoholic fatty liver disease*. World journal of gastroenterology: WJG, 2014. **20**(28): p. 9338.

92. Belfort, R., et al., *A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis*. N Engl J Med, 2006. **2006**(355): p. 2297-2307.
93. Harrison, S.A., et al., *Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. The American journal of gastroenterology, 2003. **98**(11): p. 2485.
94. Sanyal, A.J., et al., *Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis*. New England Journal of Medicine, 2010. **362**(18): p. 1675-1685.
95. Athyros, V.G., et al., *Safety and efficacy of long-term statin treatment for cardiovascular events in patients with coronary heart disease and abnormal liver tests in the Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation (GREACE) Study: a post-hoc analysis*. The Lancet, 2010. **376**(9756): p. 1916-1922.
96. Zeng, T., et al., *Pentoxifylline for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized double-blind, placebo-controlled studies*. European journal of gastroenterology & hepatology, 2014. **26**(6): p. 646-653.
97. Froehner, S.C., *Peripheral proteins of postsynaptic membranes from Torpedo electric organ identified with monoclonal antibodies*. The Journal of cell biology, 1984. **99**(1): p. 88-96.
98. Froehner, S.C., et al., *A postsynaptic Mr 58,000 (58K) protein concentrated at acetylcholine receptor-rich sites in Torpedo electroplaques and skeletal muscle*. The Journal of cell biology, 1987. **104**(6): p. 1633-1646.
99. Adams, M.E., et al., *Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution*. Neuron, 1993. **11**(3): p. 531-540.
100. Alessi, A., et al., *γ -Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the α/β syntrophins*. Experimental cell research, 2006. **312**(16): p. 3084-3095.
101. Ahn, A.H., et al., *The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(5): p. 2724-2730.
102. Piluso, G., et al., *γ 1-and γ 2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(21): p. 15851-15860.
103. Bhat, H.F., et al., *Alpha-1-syntrophin protein is differentially expressed in human cancers*. Biomarkers, 2011. **16**(1): p. 31-36.
104. Adams, M.E., et al., *Mouse α 1-and β 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(43): p. 25859-25865.
105. Kramarcy, N.R. and R. Sealock, *Syntrophin isoforms at the neuromuscular junction: developmental time course and differential localization*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2000. **15**(3): p. 262-274.
106. Gallagher, E.J., D. LeRoith, and E. Karnieli, *Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome*. Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine, 2010. **77**(5): p. 511-523.
107. Mulvey, C., et al., *Expression of the skeletal muscle dystrophin–dystroglycan complex and syntrophin–nitric oxide synthase complex is severely affected in the type 2 diabetic Goto–Kakizaki rat*. European journal of cell biology, 2005. **84**(11): p. 867-883.
108. Boyle, K.E., et al., *Gestational diabetes is characterized by reduced mitochondrial protein expression and altered calcium signaling proteins in skeletal muscle*. PloS one, 2014. **9**(9): p. e106872.
109. Butler, M.H., et al., *Association of the Mr 58,000 postsynaptic protein of electric tissue with Torpedo dystrophin and the Mr 87,000 postsynaptic protein*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(9): p. 6213-6218.
110. Kramarcy, N.R., et al., *Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M (r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin)*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(4): p. 2870-2876.
111. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. Physiological reviews, 2002. **82**(2): p. 291-329.
112. Adams, M.E., et al., *Structural abnormalities at neuromuscular synapses lacking multiple syntrophin isoforms*. Journal of Neuroscience, 2004. **24**(46): p. 10302-10309.
113. Hosaka, Y., et al., *α 1-Syntrophin–deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration*. The Journal of cell biology, 2002. **158**(6): p. 1097-1107.

114. Adams, M.E., et al., *Absence of α -syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin*. The Journal of cell biology, 2000. **150**(6): p. 1385-1398.
115. Iwata, Y., et al., *Syntrophin is an actin-binding protein the cellular localization of which is regulated through cytoskeletal reorganization in skeletal muscle cells*. European journal of cell biology, 2004. **83**(10): p. 555-565.
116. Suzuki, A., M. Yoshida, and E. Ozawa, *Mammalian alpha 1-and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus*. The Journal of cell biology, 1995. **128**(3): p. 373-381.
117. Ding, Y., et al., *Proteomic profiling of lipid droplet-associated proteins in primary adipocytes of normal and obese mouse*. Acta Biochim Biophys Sin, 2012. **44**(5): p. 394-406.
118. Gee, S.H., et al., *Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins*. Journal of Neuroscience, 1998. **18**(1): p. 128-137.
119. Neely, J.D., et al., *Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(24): p. 14108-14113.
120. Connors, N.C., et al., *The potassium channel Kir4. 1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via α -syntrophin in glia*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(27): p. 28387-28392.
121. Leonoudakis, D., et al., *Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2. x)-associated proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(21): p. 22331-22346.
122. Tian, M., et al., *Dystroglycan in the Cerebellum is a Laminin α 2-chain Binding Protein at the Glial-Vascular Interface and is Expressed in Purkinje cells*. European Journal of Neuroscience, 1996. **8**(12): p. 2739-2747.
123. Adams, M.E., H.A. Mueller, and S.C. Froehner, *In vivo requirement of the α -syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4*. J Cell Biol, 2001. **155**(1): p. 113-122.
124. Wu, G., et al., *α -1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome*. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology, 2008. **1**(3): p. 193-201.
125. Cheng, J., et al., *α 1-Syntrophin mutations identified in sudden infant death syndrome cause an increase in late cardiac sodium current*. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology, 2009. **2**(6): p. 667-676.
126. Lyssand, J.S., et al., *Blood pressure is regulated by an α 1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(27): p. 18792-18800.
127. Chen, Z., et al., *Syntrophins regulate α 1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(18): p. 12414-12420.
128. Zhong, H. and K.P. Minneman, *α 1-Adrenoceptor subtypes*. European journal of pharmacology, 1999. **375**(1): p. 261-276.
129. Munehira, Y., et al., *α 1-Syntrophin modulates turnover of ABCA1*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(15): p. 15091-15095.
130. Okuhira, K.-i., et al., *Purification of ATP-binding cassette transporter A1 and associated binding proteins reveals the importance of β 1-syntrophin in cholesterol efflux*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(47): p. 39653-39664.
131. Buechler, C., et al., *The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a β 2-syntrophin/utrophin complex*. Biochemical and biophysical research communications, 2002. **293**(2): p. 759-765.
132. Chung, S., et al., *Targeted deletion of hepatocyte ABCA1 leads to very low density lipoprotein triglyceride overproduction and low density lipoprotein hypercatabolism*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(16): p. 12197-12209.
133. de Haan, W., et al., *ABCA1 in adipocytes regulates adipose tissue lipid content, glucose tolerance, and insulin sensitivity*. Journal of lipid research, 2014. **55**(3): p. 516-523.
134. Tamehiro, N., et al., *LXR Agonism Upregulates the Macrophage ABCA1/Syntrophin Protein Complex That Can Bind ApoA-I and Stabilized ABCA1 Protein, but Complex Loss Does Not Inhibit Lipid Efflux*. Biochemistry, 2015. **54**(46): p. 6931-6941.
135. Buechler, C. and S. Bauer, *ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) associated proteins: potential drug targets in the metabolic syndrome and atherosclerotic disease?* Current pharmaceutical biotechnology, 2012. **13**(2): p. 319-330.

136. Hebel, T., et al., *Lipid abnormalities in alpha/beta2-syntrophin null mice are independent from ABCA1*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2015. **1851**(5): p. 527-536.
137. Rigotti, A., et al., *A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(23): p. 12610-12615.
138. Yesilaltay, A., et al., *Regulation of SR-BI-mediated high-density lipoprotein metabolism by the tissue-specific adaptor protein PDZK1*. Current opinion in lipidology, 2005. **16**(2): p. 147-152.
139. Brenman, J.E., et al., *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains*. Cell, 1996. **84**(5): p. 757-767.
140. Hashida-Okumura, A., et al., *Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with α 1-syntrophin in rat brain*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(17): p. 11736-11741.
141. Krause, M., et al., *The effects of aerobic exercise training at two different intensities in obesity and type 2 diabetes: implications for oxidative stress, low-grade inflammation and nitric oxide production*. European journal of applied physiology, 2014. **114**(2): p. 251-260.
142. Kameya, S., et al., *α 1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(4): p. 2193-2200.
143. Moon, J.Y., et al., *α -Syntrophin stabilises catalase to reduce endogenous reactive oxygen species levels during myoblast differentiation*. The FEBS Journal, 2017.
144. Oak, S.A., et al., *Mouse α 1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling*. Biochemistry, 2001. **40**(37): p. 11270-11278.
145. Bhat, S.S., et al., *Actin depolymerization mediated loss of SNTA1 phosphorylation and Rac1 activity has implications on ROS production, cell migration and apoptosis*. Apoptosis, 2016. **21**(6): p. 737-748.
146. Bhat, H., et al., *Role of SNTA1 in Rac1 activation, modulation of ROS generation, and migratory potential of human breast cancer cells*. British journal of cancer, 2014. **110**(3): p. 706.
147. Kazanietz, M.G. and M.-J. Caloca, *The Rac GTPase in cancer: from old concepts to new paradigms*. Cancer research, 2017: p. canres. 1456.2017.
148. Bhat, S., et al., *Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study*. Journal of the National Cancer Institute, 2011. **103**(13): p. 1049-1057.
149. Bhat, H.F., M.E. Adams, and F.A. Khanday, *Syntrophin proteins as Santa Claus: role (s) in cell signal transduction*. Cellular and molecular life sciences, 2013. **70**(14): p. 2533-2554.
150. Frank, P.G., et al., *Role of caveolin-1 in the regulation of lipoprotein metabolism*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2008. **295**(1): p. C242-C248.
151. Greene, F.L. and L.H. Sobin, *A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC*. Journal of surgical oncology, 2009. **99**(5): p. 269-272.
152. Caballero, F., et al., *Specific Contribution of Methionine and Choline in Nutritional Nonalcoholic Steatohepatitis IMPACT ON MITOCHONDRIAL S-ADENOSYL-L-METHIONINE AND GLUTATHIONE*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(24): p. 18528-18536.
153. Jha, P., et al., *Role of adipose tissue in methionine–choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2014. **1842**(7): p. 959-970.
154. Vergnes, L., et al., *Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(44): p. 42774-42784.
155. Matsuzawa, N., et al., *Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet*. Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1392-1403.
156. Damm, G., et al., *Human parenchymal and non-parenchymal liver cell isolation, culture and characterization*. Hepatology international, 2013. **7**(4): p. 951-958.
157. Mello, C.C. and D. Conte Jr, *Revealing the world of RNA interference*. nature, 2004. **431**(7006): p. 338.

158. Haslam, G., D. Wyatt, and P.A. Kitos, *Estimating the number of viable animal cells in multi-well ceultures based on their lactate dehydrogenase activities*. Cytotechnology, 2000. **32**: p. 63-75.
159. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. Journal of molecular biology, 1983. **166**(4): p. 557-580.
160. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1350-1354.
161. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical biochemistry, 1987. **162**(1): p. 156-159.
162. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome research, 1996. **6**(10): p. 986-994.
163. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Nature Biotechnology, 1993. **11**(9): p. 1026-1030.
164. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. **39**(1): p. 75-88.
165. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
166. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
167. Bhuyan, A.K., *On the mechanism of SDS-induced protein denaturation*. Biopolymers, 2010. **93**(2): p. 186-199.
168. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
169. Eisinger, K., et al., *The adaptor protein alpha-syntrophin regulates adipocyte lipid droplet growth*. Experimental cell research, 2016. **345**(1): p. 100-107.
170. Zimny, S., et al., *Chemokine (CC-motif) receptor-like 2 mRNA is expressed in hepatic stellate cells and is positively associated with characteristics of non-alcoholic steatohepatitis in mice and men*. Experimental and molecular pathology, 2017. **103**(1): p. 1-8.
171. Kawashiri, M.-a., C. Maugeais, and D.J. Rader, *High-density lipoprotein metabolism: molecular targets for new therapies for atherosclerosis*. Current atherosclerosis reports, 2000. **2**(5): p. 363-372.
172. Zannis, V.I., A. Chroni, and M. Krieger, *Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL*. Journal of molecular medicine, 2006. **84**(4): p. 276-294.
173. Leiva, A., et al., *Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism*. Atherosclerosis, 2011. **217**(2): p. 299-307.
174. Rein-Fischboeck, L., et al., *Hepatic scavenger receptor BI is associated with type 2 diabetes but unrelated to human and murine non-alcoholic fatty liver disease*. Biochemical and biophysical research communications, 2015. **467**(2): p. 377-382.
175. Krautbauer, S., et al., *Manganese superoxide dismutase is reduced in the liver of male but not female humans and rodents with non-alcoholic fatty liver disease*. Experimental and molecular pathology, 2013. **95**(3): p. 330-335.
176. Rinella, M.E., et al., *Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet*. Journal of lipid research, 2008. **49**(5): p. 1068-1076.
177. Makki, K., P. Froguel, and I. Wolowczuk, *Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines*. ISRN inflammation, 2013. **2013**.
178. Buechler, C., et al., *Adipokines in Liver Cirrhosis*. International journal of molecular sciences, 2017. **18**(7): p. 1392.
179. Yilmaz, Y., et al., *Serum levels of omentin, chemerin and adipsin in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease*. Scandinavian journal of gastroenterology, 2011. **46**(1): p. 91-97.
180. Kukla, M., et al., *Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease*. Scandinavian journal of gastroenterology, 2010. **45**(2): p. 235-242.
181. Döcke, S., et al., *Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease*. European journal of endocrinology, 2013. **169**(5): p. 547-557.
182. Ye, Z., et al., *Serum lipocalin-2, cathepsin S and chemerin levels and nonalcoholic fatty liver disease*. Molecular biology reports, 2014. **41**(3): p. 1317-1323.

183. Ferre, P. and F. Foufelle, *Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2010. **12**(s2): p. 83-92.
184. Sampath, H. and J.M. Ntambi, *The role of stearyl-CoA desaturase in obesity, insulin resistance, and inflammation*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1243**(1): p. 47-53.
185. KATSURADA, A., et al., *Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver*. The FEBS Journal, 1990. **190**(2): p. 427-433.
186. Wang, P.-y., J. Weng, and R.G. Anderson, *OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK1/2 activation*. Science, 2005. **307**(5714): p. 1472-1476.
187. Valacchi, G., et al., *Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1229**(1).
188. Jablonski, K.A., et al., *Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages*. PloS one, 2015. **10**(12): p. e0145342.
189. Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein, *Scavenger receptors in homeostasis and immunity*. Nature reviews. Immunology, 2013. **13**(9): p. 621.
190. McCullen, M.V., et al., *Analysis of Ly49 gene transcripts in mature NK cells supports a role for the Pro1 element in gene activation, not gene expression*. Genes and immunity, 2016. **17**(6): p. 349-357.
191. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(5): p. 953-960.
192. Remy, I., A. Montmarquette, and S.W. Michnick, *PKB/Akt modulates TGF- β signalling through a direct interaction with Smad3*. Nature cell biology, 2004. **6**(4): p. 358.
193. Leclercq, I.A., et al., *CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(8): p. 1067.
194. JEONG, W.-I., et al., *Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats*. Journal of veterinary medical science, 2005. **67**(3): p. 235-242.
195. Paigen, B., et al., *Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice*. Atherosclerosis, 1985. **57**(1): p. 65-73.
196. Garofalo, R.S., et al., *Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β* . Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(2): p. 197.
197. Brazil, D.P. and B.A. Hemmings, *Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow*. Trends in biochemical sciences, 2001. **26**(11): p. 657-664.
198. Zhou, L., et al., *Cidea promotes hepatic steatosis by sensing dietary fatty acids*. Hepatology, 2012. **56**(1): p. 95-107.
199. Langhi, C. and Á. Baldán, *CIDE/CSP27 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and plays a critical role in fasting-and diet-induced hepatosteatosis*. Hepatology, 2015. **61**(4): p. 1227-1238.
200. Xu, W., et al., *Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor- α -like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(9): p. 4282-4293.
201. Colonna, M., J. Samaridis, and L. Angman, *Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells*. European journal of immunology, 2000. **30**(2): p. 697-704.
202. Hardwick, J.P., *Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases*. Biochemical pharmacology, 2008. **75**(12): p. 2263-2275.
203. Abbaszade, I.G., et al., *The mouse 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins*. Molecular Endocrinology, 1995. **9**(9): p. 1214-1222.
204. Ye, Z., et al., *Inflammation protein SAA2. 2 spontaneously forms marginally stable amyloid fibrils at physiological temperature*. Biochemistry, 2011. **50**(43): p. 9184-9191.
205. Daniel, H. and G. Kottra, *The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology*. Pflügers Archiv, 2004. **447**(5): p. 610-618.
206. Aibara, D., et al., *Expression of hepatic fat-specific protein 27 depends on the specific etiology of fatty liver*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2013. **36**(11): p. 1766-1772.

207. Stanchi, F., et al., *TUBA8: a new tissue-specific isoform of α -tubulin that is highly conserved in human and mouse*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **270**(3): p. 1111-1118.
208. Kamino, H., R. Moore, and M. Negishi, *Role of a novel CAR-induced gene, TUBA8, in hepatocellular carcinoma cell lines*. Cancer genetics, 2011. **204**(7): p. 382-391.
209. Eisinger, K., et al., *Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice*. International journal of molecular sciences, 2014. **15**(2): p. 2991-3002.
210. Chen, S., et al., *Deletion of Gab2 in mice protects against hepatic steatosis and steatohepatitis: a novel therapeutic target for fatty liver disease*. Journal of molecular cell biology, 2016. **8**(6): p. 492-504.
211. Jia, X., et al., *Emodin attenuates systemic and liver inflammation in hyperlipidemic mice administrated with lipopolysaccharides*. Experimental Biology and Medicine, 2014. **239**(8): p. 1025-1035.
212. Loomba, R., et al., *Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 943-951.
213. Argo, C.K., et al., *Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis*. Journal of hepatology, 2009. **51**(2): p. 371-379.
214. Cai, L., et al., *Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages*. Journal of lipid research, 2012. **53**(8): p. 1472-1481.
215. Song, G.J., et al., *SR-BI mediates high density lipoprotein (HDL)-induced anti-inflammatory effect in macrophages*. Biochemical and biophysical research communications, 2015. **457**(1): p. 112-118.
216. Schattenberg, J. and P. Galle, *Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man*. Digestive Diseases, 2010. **28**(1): p. 247-254.
217. Rizki, G., et al., *Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1*. Journal of lipid research, 2006. **47**(10): p. 2280-2290.
218. Wade, R.H., *On and around microtubules: an overview*. Molecular biotechnology, 2009. **43**(2): p. 177-191.
219. Dorn, C., et al., *Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease*. International journal of clinical and experimental pathology, 2010. **3**(5): p. 505.
220. Parton, R.G., *Caveolae and caveolins*. Current opinion in cell biology, 1996. **8**(4): p. 542-548.
221. Frank, P.G., et al., *Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004. **24**(1): p. 98-105.
222. Seki, S., et al., *The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1. 1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses*. Immunological reviews, 2000. **174**(1): p. 35-46.
223. Miller, R.A., *Age-related changes in T cell surface markers: a longitudinal analysis in genetically heterogeneous mice*. Mechanisms of ageing and development, 1997. **96**(1): p. 181-196.
224. Kassel, K.M., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1-deficiency does not affect steatosis or inflammation in livers of mice fed a methionine-choline-deficient diet*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2010. **90**(12): p. 1794.
225. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. nature, 1995. **378**(6559): p. 785.
226. Mackenzie, R.W. and B.T. Elliott, *Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes*. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy, 2014. **7**: p. 55.
227. Wang, Q.A., et al., *Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration*. Nature medicine, 2013. **19**(10): p. 1338-1344.
228. Haukeland, J.W., et al., *Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2*. Journal of hepatology, 2006. **44**(6): p. 1167-1174.
229. Saberi, M., et al., *Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice*. Cell metabolism, 2009. **10**(5): p. 419-429.

230. Seki, E., et al., *TLR4 enhances TGF-[beta] signaling and hepatic fibrosis*. Nature medicine, 2007. **13**(11): p. 1324.
231. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(4): p. 2247-2250.
232. Xu, M.-J., et al., *Fat-specific protein 27/CIDEA promotes development of alcoholic steatohepatitis in mice and humans*. Gastroenterology, 2015. **149**(4): p. 1030-1041. e6.
233. Fuller, G.L., et al., *The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(17): p. 12397-12409.
234. Kubota, T., et al., *Eicosapentaenoic acid is converted via ω -3 epoxidation to the anti-inflammatory metabolite 12-hydroxy-17, 18-epoxyeicosatetraenoic acid*. The FASEB Journal, 2014. **28**(2): p. 586-593.
235. Monteiro, J., et al., *The role of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids in the manifestation of the metabolic syndrome in cardiovascular disease and non-alcoholic fatty liver disease*. Food & function, 2014. **5**(3): p. 426-435.
236. Muller, D.N., et al., *Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender-and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation*. Biochemical Journal, 2007. **403**(1): p. 109-118.
237. Nakamura, N., et al., *Endosomes are specialized platforms for bacterial sensing and NOD2 signalling*. nature, 2014. **509**(7499): p. 240.
238. Sanchez-Gurmaches, J. and D.A. Guertin, *Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2014. **1842**(3): p. 340-351.
239. Buechler, C. and T. S Weiss, *Does hepatic steatosis affect drug metabolizing enzymes in the liver?* Current drug metabolism, 2011. **12**(1): p. 24-34.
240. Konno, Y., M. Negishi, and S. Kodama, *The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism*. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2008. **23**(1): p. 8-13.
241. Yamazaki, Y., et al., *The role of the nuclear receptor constitutive androstane receptor in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2007. **56**(4): p. 565-574.
242. Ballardini, G., et al., *Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis*. Virchows Archiv B Cell Pathology Zell-pathologie, 1988. **56**(1): p. 45-49.
243. Thompson, A.I., K.P. Conroy, and N.C. Henderson, *Hepatic stellate cells: central modulators of hepatic carcinogenesis*. BMC gastroenterology, 2015. **15**(1): p. 63.
244. Kuramitsu, Y., et al., *Up-regulation of 42 kDa tubulin alpha-6 chain fragment in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus*. Anticancer research, 2011. **31**(10): p. 3331-3336.
245. Lu, C., et al., *Increased α -tubulin1b expression indicates poor prognosis and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma*. Digestive diseases and sciences, 2013. **58**(9): p. 2713-2720.
246. Little, M. and T. Seehaus, *Comparative analysis of tubulin sequences*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1988. **90**(4): p. 655-670.
247. Serrano, L., et al., *Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(19): p. 5989-5993.
248. Ludueña, R.F., *Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications*. International review of cytology, 1997. **178**: p. 207-275.
249. Nogales, E., et al., *High-resolution model of the microtubule*. Cell, 1999. **96**(1): p. 79-88.
250. Mauvoisin, D. and C. Mounier, *Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression*. Biochimie, 2011. **93**(1): p. 78-86.

6.7 Danksagung

Mein größter Dank geht an Prof. Dr. Christa Büchler. In den letzten drei Jahren hat sie mich in meiner Arbeit unterstützt, motiviert, mir vieles ermöglicht und ist mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Das Besondere dabei war ihr unglaublicher Rückhalt und ihr Durchhaltevermögen außerhalb des Laboralltags. Ich danke dir dafür, dass du an uns und unsere Arbeit geglaubt und daran festgehalten hast.

Danke sagen möchte ich auch Prof. Dr. Richard Warth, der mich als Mentor während der Promotion fachkundig und interessiert betreut hat, das Zweitgutachten erstellt und als Zweitprüfer in meinem Kolloquium fungiert.

Bei Prof. Dr. Charalampos Aslanidis bedanke ich mich für die Übernahme des Amts des Drittprüfers im Prüfungsausschuss, die schnelle Hilfe bei Problemen und das Interesse an unserer Arbeit.

Dr. Wolfgang Mages hat meine Promotion als Mentor mit seinem Wissen, seinem Interesse und seiner Hilfsbereitschaft sehr bereichert. Vielen Dank dafür.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Ernst Tamm für die Übernahme des Vorsitzes meiner Dissertationsprüfung bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freundinnen Becky und Lisa. Wenn ich so zurückdenke, waren wir schon ein tolles Team. Uns wurden viele Steine in den Weg gelegt und dennoch konnte uns nichts und niemand aufhalten. Die letzten Jahre waren oft anstrengend, nervenaufreibend und doch etwas ganz Besonderes. In unserem Team konnte sich jeder auf jeden verlassen. Ich kann mir niemanden besseren vorstellen mit denen ich diese Zeit hätte lieber verbringen wollen. Ich werde unsere gemeinsame Zeit sehr vermissen. Ich danke euch dafür!

Bei Dr. Sabrina Krautbauer möchte ich mich zuerst für die herzliche Aufnahme in das Laborteam, die vielen beantworteten Fragen, die aufschlussreichen Diskussionen und schließlich für ihre Freundschaft bedanken.

Mein Dank geht auch an alle anderen Kollegen innerhalb und außerhalb der Arbeitsgruppe: Kristina Eisinger, Susanne Feder, Madlen Melzer, Tanja Späth und allen anderen Mitarbeiter der AG Straub, AG Kabesch und AG Treeck. Vielen Dank für die vielen fachlichen und privaten Gespräche, dem Austausch von Wissen und auch des ein oder anderen Eppis.

Vielen Dank an meine „biologischen“ und „nicht-biologischen“ Freunde für den starken Spaß, den wir miteinander haben.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank. Mama, Papa, meinen Geschwistern Benjamin, Anni, Johannes und Laura sowie meinen Schwiegereltern Birgit und Josef und meiner Schwägerin Katharina mit Benny und Karlotti. Ihr seid für mich meine Basis bei der ich immer große Unterstützung, Zuversicht und Hilfe finden werde. Vielen Dank dafür!

Julian, mein Ehemann, mit dir an meiner Seite ist alles Schlechte nur halb so schlimm und alles Schöne noch viel, viel schöner. Und so war es auch während meiner Promotion. Vielen Dank für deine bedingungslose Unterstützung, Liebe und Bereitschaft zur Erfüllung meiner Wünsche.